

Use of specified enzymes, especially lysyl oxidase, as protein crosslinking agents for formulating compositions containing active ingredients

Publication number: DE19840489 (A1)
Publication date: 2000-03-09
Inventor(s): FRIEDRICH THOMAS [DE]; BEWERT WOLFGANG [DE]; LUEDDECKE ERIK [DE]; KLINGLER JUERGEN [DE]; HEGER ROBERT [DE]
Applicant(s): BASF AG [DE]
Classification:
- international: **A23K1/00; A23K1/16; A23K1/165; A23L1/00; A23L1/302; A23P1/04; A61K9/16; C12N9/06; A23B5/00; A23K1/00; A23K1/16; A23K1/165; A23L1/00; A23L1/302; A23P1/04; A61K9/16; C12N9/06; A23B5/00; (IPC1-7): C07K7/08; A23K1/16; A23L1/30; A61K31/07; A61K31/366; A61K31/592**
- European: A23K1/00B3; A23K1/16B; A23K1/16C; A23K1/165B; A23L1/00P4; A23L1/302; A23P1/04; A61K9/16H6H; A61K9/16H8; C12N9/06
Application number: DE19981040489 19980904
Priority number(s): DE19981040489 19980904

Abstract of DE 19840489 (A1)

An enzyme (I) selected from lipoxygenases, protein disulfide isomerases, phenol oxidases and peroxidases, lysyl oxidases, protein disulfide reductases, tyrosine oxidases or sulfhydryl oxidases is used to formulate compositions containing active ingredients. Independent claims are also included for the following: (1) a process for producing compositions in which one or more active ingredients are surrounded by at least one layer, where at least part of at least one layer comprises a protein that has been crosslinked with (I). (2) a composition in which at least part of at least one layer surrounding one or more active ingredients comprises a protein that has been crosslinked with (I); (3) an isolated protein comprising at least one of amino acid sequences (II)-(XIII): (a) G(S)(C)Q(C)KTNEKVNIEAPKPN(C)DT (L)(S) (b) EYP(C)APDVVYNTK (c) GGTYSTVTQNPTLNR (d) DYNIMPGGGXVHR (e) ATGGTYSTVXAQN (f) APETENNAR (g) GPL(P)VNE(E)TTIEPLSFYNT (h) IYELSLQELIAEYGSDDPNNQHTFYSDI (i) DNVDDLSTCTIQR (j) VAPETENCAR (k) NVDVEYPCAPGVVYNTK (l) GYPNAEY(S)LDF/ER, in which lysine *iota* -amino groups are optionally oxidized to aldehyde groups; and (4) a food or animal feed containing the composition of (2).

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



19 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 198 40 489 A 1**

51 Int. Cl. 7:
C 07 K 7/08
A 61 K 31/07
A 61 K 31/592
A 61 K 31/366
A 23 L 1/30
A 23 K 1/16

21 Aktenzeichen: 198 40 489.1
22 Anmeldetag: 4. 9. 1998
43 Offenlegungstag: 9. 3. 2000

DE 198 40 489 A 1

71 Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

72 Erfinder:
Friedrich, Thomas, Dr., 64283 Darmstadt, DE;
Bewert, Wolfgang, Dr., 67227 Frankenthal, DE;
Lüddecke, Erik, Dr., 67112 Mutterstadt, DE; Klingler,
Jürgen, Dr., 67112 Mutterstadt, DE; Heger, Robert,
Dr., 69124 Heidelberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Wirkstoffzubereitungen sowie ein Verfahren zu deren Herstellung

57 Die vorliegende Erfindung betrifft Wirkstoffzubereitungen, bei denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht oder Teile einer Schicht aus einem Protein umgeben sind, das mit einem Enzym, ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen oder Sulfhydryloxidasen, quervernetzt wurde.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym, ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen oder Sulfhydryloxidasen, quervernetzt wurde sowie die Verwendung der genannten Enzyme zur Formulierung von Wirkstoffen.

Weiterhin betrifft die Erfindung Lebensmittel, Futtermittel oder pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend die erfindungsgemäße Wirkstoffzubereitung sowie das Enzym Lysyloxidase. Im Besonderen betrifft die Erfindung Trockenpulver, die Vitamine, Enzyme, Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe, wie z. B. Carotinoide, enthalten. Außerdem können noch verschiedene Zusatzstoffe eingebettet sein.

DE 198 40 489 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Wirkstoffzubereitungen, bei denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht oder Teilen einer Schicht aus einem Protein umgeben sind, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde sowie die Verwendung der genannten Enzyme zur Formulierung von Wirkstoffen.

Weiterhin betrifft die Erfindung Lebensmittel, Futtermittel oder pharmazeutische Zubereitungen enthaltend die erfindungsgemäße Wirkstoffzubereitung sowie das Enzym Lysyloxidase. Im Besonderen betrifft die Erfindung Trockenpulver, die Vitamine, Enzyme, Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe, wie z. B. Carotinoide enthalten. Außerdem können gegebenenfalls noch verschiedene Zusatzstoffe eingebettet sein.

Pulverförmige Wirkstoffzubereitungen wie Vitamin- und Carotinoid-Präparate sind allgemein bekannt und werden in der pharmazeutischen Industrie sowie in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie in großem Umfang verwendet. In der Literatur werden viele Verfahren zur Herstellung geeigneter Präparate beschrieben.

Zur Herstellung von pulverförmigen Zubereitungen, in denen oxidationsempfindliche Stoffe wie öllösliche Vitamine oder Carotinoide gegen oxidative Einflüsse geschützt werden sollen, werden verschiedene Herstellverfahren, insbesondere Sprühverfahren beschrieben.

In der deutschen Patentschrift 10 35 319 wird beschrieben, wie eine Dispersion eines öligen Vitamins in einen hohen Überschuß von pulverförmiger Stärke mit einem geringen Feuchtegehalt (unter 8%) versprüht wird. Durch das trockene Stärkepulver wird den versprühten Partikeln Wasser entzogen. Hierdurch erstarren sie, wobei eine große Menge der Stärke an der Oberfläche der Partikel haften bleibt. Außerdem muß der überschüssige Stärkeanteil abgetrennt und anschließend wieder dem Prozeß zugeführt werden.

In der schweizerischen Patentschrift 488 455 wird dargelegt, daß als Puderungsmittel ein Gemisch aus anorganischen Substanzen eingesetzt wird, das aus wasserabweisenden und wasserabsorbierenden Substanzen besteht. Hierdurch soll die Explosionsgefahr, die durch die trockene, feinverteilte Stärke besteht, vermieden werden.

Aus der schweizerischen Patentschrift 389 505 ist bekannt, daß die Dispersion des Wirkstoffs in ein gekühltes, gasförmiges Medium versprüht wird, in dem die versprühten Partikel durch Abkühlung erstarren. Für diesen Prozeß werden Fallhöhen von bis zu 15 m benötigt, außerdem müssen die Temperaturen deutlich unter Raumtemperatur gehalten werden.

Eine weitere Methode zur Verfestigung der versprühten Partikel kann auch durch Auffangen in einem Pulver, das aus Metallsalzen höherer Fettsäuren besteht, erfolgen. Dieses Verfahren wird in der schweizerischen Patentschrift 431 252 beschrieben.

Eine alternative Methode zur Herstellung von wirkstoffhaltigen, stabilen Zubereitungen wird in der europäischen Patentschrift EP-A-0 618 001 beschrieben. Hier erfolgt die Herstellung der kugelförmigen Partikel, die eine Einbettung des Wirkstoffs in einem Gemisch aus verschiedenen Trägersubstanzen darstellen, indem man zunächst durch kontrollierte Teilung Kügelchen aus einer primären Öl-in-Wasser-Emulsion bildet, die aus der Zugabe von Wirkstoffen, ölförmigen Stoffen, Proteinen und Wasser zum einem nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel besteht, und anschließend die erhaltenen Kügelchen abtrennt. Für die Herstellung der Kügelchen ist ein spezielles Mischsystem erforderlich. Die hierbei erhaltenen Partikel werden anschließend mit einem Aldehyd, beispielsweise Acetaldehyd, Glutaraldehyd oder Glyoxal nachbehandelt, wodurch eine chemische Vernetzung, die sich auch in der Wasserunlöslichkeit des erhaltenen Materials ausdrückt, und damit eine zusätzliche Stabilisierung des Wirkstoffs erreicht wird.

In der amerikanischen Patentschrift 4 670 247 wird eine weitere Methode zur Herstellung von vernetzten Partikeln beschrieben. Hierzu wird zunächst eine Emulsion, die im wesentlichen aus einem öllöslichen Vitamin, einem Schutzkolloid wie z. B. Gelatine und einem reduzierenden Zucker besteht, durch einen Sprüh- und Trocknungsprozeß in pulverförmige Partikel überführt. Diese Partikel werden anschließend in einem thermischen Prozeß bei Temperaturen zwischen 105 und 180°C behandelt. In einer Maillard-Reaktion zwischen den Aminogruppen der Proteine und den Oxo-Gruppen der reduzierenden Zucker wird dabei eine Wasserunlöslichkeit der Trockenpulverpartikel erzielt, die durch eine Vernetzung der Matrixbestandteile erreicht wird.

In EP 782883 werden eßbare Mikrokapseln beschrieben, die eine Kapselwand enthalten, die durch Aussalzen des Proteins mit einem eßbaren Salz und Vernetzung der Kapselwand mit Transglutaminase hergestellt werden. Nachteilig bei dieser Methode ist, daß sie nicht breit anwendbar ist. So ist die Transglutaminase beispielsweise für Sprühformulierungen ungeeignet, da sie versprühte und getrocknete Wirkstoffformulierungen nicht mehr richtig quervernetzen kann und so die Wirkstoffe während der Lagerung schon einem verstärkten Abbau ausgesetzt sind. Wartet man bis die Quervernetzung durch die enzymatische Aktivität abgeschlossen ist, so lassen sich die Formulierungen nicht mehr versprühen.

Wenn oxidationsempfindliche Verbindungen, in diesem Falle insbesondere fettlösliche Vitamine und Carotinoide, mit Luft in Kontakt kommen, erfolgt eine Umsetzung mit Sauerstoff, die zu einem Wirkstoffverlust durch Umsetzung zu ungewünschten Verbindungen führt. Um diese Oxidation zu verhindern, kann man zum Beispiel bestimmte Zusätze den Zubereitungen hinzufügen, die durch Umsetzung mit reaktiven Gruppen der Proteine diese wiederum weniger durchlässig für Sauerstoff machen und dadurch den Wirkstoffen einen stabilisierenden Schutz verleihen. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß durch Umsetzung von Proteinen mit reduzierenden Zuckern im Sinne einer Maillard-Reaktion die Löslichkeit der Proteine in Wasser verhindert wird. Weiterhin kann durch Umsetzung der Proteine mit Aldehyden eine Vernetzung erreicht werden, die ebenfalls der Trägermatrix eine erhöhte Stabilität verleiht.

Diese Verfahren zeigen jedoch bestimmte Nachteile, die es wünschenswert erscheinen lassen, nach verbesserten Sta-

bilisierungsverfahren zu suchen. So bedeutet die Anwendung einer Maillard-Reaktion zwischen einem Protein und reduzierenden Zuckern in jedem Falle eine thermische Belastung und damit zumindest in einem geringen Maße einen Abbau des Wirkstoffs. Außerdem neigen die Produkte zu einer bräunlichen Färbung. Ein Verfahren zur Formulierung von Wirkstoffen über Maillard-Reaktion ist beispielsweise der Patentanmeldung EP-A-0 547 422 zu entnehmen.

Von Nachteil bei der Verwendung von chemischen Agentien wie Aldehyden oder Säuren wie Tanninsäure als Vernetzungsmittel ist, daß zur Vernetzung hochreaktive und gesundheitlich nicht unbedenkliche Zusatzstoffe eingesetzt werden. Die Produkte, die nach diesen Verfahren hergestellt werden, finden beim Verbraucher nur bedingt unumschränkte Akzeptanz.

Es war daher die Aufgabe der Erfindung ein leichtes, kostengünstiges, breit anwendbares Verfahren zur Formulierung von Wirkstoffen zu entwickeln, das die oben genannten Nachteile nicht aufweist.

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde, gelöst.

Die chemische Funktion dieser Enzyme im Stoffwechsel bzw. ihre chemische Reaktion ist beispielsweise den Schriften von Green et al. (Biochem. J. 1983, 211, 481-493), Kagan et al. (Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 5, 1991, 206-210), Haywood et al. (Biochem. J., 1981, 199, 187-201) oder Matheis et al. (J. Food Biochem. 11, 1987, 309-327) zu entnehmen.

Durch die vorteilhafte enzymatischen Vernetzung im erfindungsgemäßen Verfahren wird sowohl eine thermische Belastung der Wirkstoffe wie bei der thermischen Vernetzung der Protein/Zuckerschicht und ein damit verbundenes Bräunen der Wirkstoffformulierungen über die Maillardreaktion sowie die Verwendung reaktiver chemischer Substanzen wie Aldehyde vermieden. Die Maillardreaktion bei der thermischen Vernetzung führt zu einer Verknüpfung von reduzierenden Zuckern mit den freien Aminogruppen der Proteine oder sonstigen freien Aminogruppen und damit zu einer Stabilisierung der Wirkstoffformulierungen. Bei der Verwendung von chemischen Verbindungen zur Vernetzung der Proteine bilden sich Brücken zwischen den Aldehyden in der Regel den Dialdehyden und den Aminogruppen der Proteine oder sonstigen Aminogruppen aus. Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die Proteine direkt beispielsweise über in den Proteinen oder Lipoproteinen vorhandenen Fettsäureresten, über Cysteine-Cysteinbrücken (= Cystinbrücken), über Michaeladditionsprodukte oder über die Bildung von Aldehyden aus Lysin mit anschließender Vernetzung über freie Aminogruppen vernetzt.

Dies führt zu den neuen erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen enthaltend mindestens eine einen oder mehrere Wirkstoffe umgebende Schicht oder Teile einer Schicht aus einem Protein, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde. Diese erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen weisen bei einer guten Stabilität keine bräunliche Färbung auf und enthalten keine chemischen Vernetzer.

Als Wirkstoffe im erfindungsgemäßen Verfahren oder in den erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen sind prinzipiell alle in der Pharmazie, Human- oder Tierernährung verwendeten Wirkstoffe geeignet. Bevorzugte Wirkstoffe sind Vitamine, Enzyme, Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe.

Unter Enzymen im erfindungsgemäßen Verfahren oder in den Wirkstoffzubereitungen sind als Wirkstoff Enzyme wie z. B. Hydrolasen wie Amidasen, Proteasen, Lipasen, Esterasen, Phospholipasen, β -Glucosidasen, Amylasen, Nitrilasen, Mannanasen, Phytasen oder Xylanasen, Transferasen wie Methyltransferasen oder Aminotransferasen, Oxidoreduktasen wie Glucoseoxidase oder Isomerasen beispielhaft zu verstehen.

Insbesondere sind hydrophobe Wirkstoffe bevorzugt, besonders bevorzugt solche, die leicht oxidierbar sind. Solche sind die Vitamine der Gruppen A, D, E und K sowie deren Mischungen speziell den Mischungen mit Carotinoiden und/oder Xanthophyllen. Sie können im Rahmen der Erfindung in Form von Vitaminlösungen in Ölen, als Provitamine sowie als reine Vitamine natürlichen oder synthetischen Ursprungs eingesetzt werden. Von besonderem Interesse sind Präparate von Vitamin D₃, Vitamin K₁, Vitamin A und dessen Derivaten, insbesondere von Vitamin-A-Acetat, Vitamin-A-Palmitat und Vitamin-A-Propionat sowie deren Mischungen. Auch die verschiedenen Vitamin E-Derivate wie Vitamin E-Acetat, Vitamin E-Palmitat sind von Interesse. Bevorzugte Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoffe sind Carotine, Xanthophylle und Carotinoide wie β -Carotin und wie z. B.: Astaxanthin, Astacin, Bixin, Norbixin, Capsorubin, Violaxanthin, Rubixanthin, Phodoxanthin, Apo-8'-carotinsäureethylester, Neurosporaxanthin, Citranaxanthin, Canthaxanthin, Zeaxanthin, β -Apo-4'-carotinal, β -Apo-8'-carotinal, β -Apo-12'-carotinal, β -Apo-8'-carotinsäure, Lutein, Capsanthin, Lycopin sowie Ester von hydroxy- und carboxyhaltigen Vertretern dieser Gruppe, z. B. die niederen Alkylester wie Methyl- oder Ethylester oder deren Mischungen.

Die Anteile an den Wirkstoffen betragen in den erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen im allgemeinen etwa 1 bis 75 Gew.-%, vorzugsweise 5 bis 50 Gew.-%, besonders bevorzugt 10 bis 35 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse der Pulver.

Die Anteile an Vitaminen oder Carotinoiden betragen im allgemeinen etwa 5 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 10 bis 35 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse der Pulver.

Bevorzugt sind erfindungsgemäße Verfahren, bei denen eine wirkstoffhaltige Emulsion oder Dispersion in eine mit hydrophobierter Kieselsäure beladene Atmosphäre, die gegebenenfalls inertisiert sein kann, versprüht wird. Die Atmosphäre kann vorteilhaft auch mit einem anderen Puderungsmittel wie einem Mittel auf Basis eines Kohlenhydrats wie Stärke oder modifizierter Stärke beispielsweise Maisstärke beladen sein.

Außerdem sind Verfahren bevorzugt, bei denen nach dem Herstellen der Wirkstoffzubereitung beispielsweise über Versprühen getrocknet wird. Dabei wird bevorzugt bis zu einer Restfeuchte unter 10 Gew.-%, bevorzugt unter 6 Gew.-% getrocknet. Auch geringere Restfeuchten können eingestellt werden.

Die Temperatur des erfindungsgemäßen Verfahrens wird im Wesentlichen unter 80°C, bevorzugt unter 60°C, gehalten.

Die Erfindung betrifft außerdem Wirkstoffzubereitungen erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren, und

solche, die als zusätzliches Merkmal den 0,025-fachen bis 4-fachen Gewichtsanteil bezüglich Wirkstoff an Trennmittel oder Trennmittelgemischen enthalten, sowie Lebensmittel oder Futtermittel enthaltend eine solche Wirkstoffzubereitung.

Bevorzugte Trennmittel sind hydrophobisierte Kieselsäuren, Maisstärke, durch chemische Behandlung hydrophobisierte Maisstärke, Metallsalze höherer Fettsäuren und andere pflanzliche Stärken oder Mischungen dieser Trennmittel. Besonders bevorzugt sind Mischungen aus mindestens einem dieser Trennmittel mit weiteren Hilfsstoffen wie anorganischen Verbindungen, die als Gleitmittel wirken, wie zum Beispiel Neusilin® oder Zeolex®.

Im Fall von hydrophober Kieselsäure liegt der Anteil bezüglich Wirkstoff bevorzugt in einem Bereich zwischen 0,025 und 0,4, besonders bevorzugt zwischen 0,05 und 0,2. Bei Maisstärke liegt das entsprechende Verhältnis bevorzugt zwischen 0,25 und 2, besonders bevorzugt zwischen 0,5 und 1,5.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen sind erhältlich durch Herstellung einer Dispersion enthaltend im wesentlichen diese Wirkstoffe, ein Protein und weitere Träger- und Füllstoffe z. B. aus der Gruppe der Kohlenhydrate und/oder natürliche oder chemisch modifizierte Stärken. Sie kann noch weitere Zusatzstoffe wie Stabilisatoren oder Emulgierhilfsmittel enthalten. Außerdem enthält sie ein Enzym, das in der Lage ist, auf verschiedene Weise Proteinmoleküle miteinander zu verknüpfen. Die hierdurch erreichte Vernetzung verleiht dem Protein und damit auch der Matrix, in dem die Wirkstoffe eingebettet sind, eine verminderte Wasserlöslichkeit und somit eine erhöhte Stabilität.

Als Protein im erfindungsgemäßen Verfahren können prinzipiell alle Proteine verwendet werden. Bevorzugte vernetzbare Proteine sind aus wirtschaftlichen Gründen Gelatine, Kasein, Soja-Protein, Weizenproteine, Mais-Protein und Kollagen.

Bevorzugte vernetzbare Proteine sind alle Formen von pflanzlichen oder tierischen Proteine wie Gelatine, z. B. Knochengelatine, Rindergelatine, Fischgelatine, Milchproteine, wie z. B. Kasein, Sojaproteine, Weizenproteine wie Gluten, Maisproteine und Kollagene, besonders bevorzugte Proteine sind Gelatine, Milchproteine und Sojaproteine. Unter Gelatine im erfindungsgemäßen Verfahren sind alle Formen von Gelatine zu verstehen, egal, ob es sich um natürliche Gelatinen handelt oder um chemisch modifizierte Derivate.

Für die Herstellung der Dispersion wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft Gelatine des A- und B-Typs in einem weiten Bloombereich eingesetzt. Mit besonderem Vorteil arbeitet man mit Gelatine mit einem Bloomwert von etwa 50 bis etwa 250.

Die Gelatine verwendet man erfindungsgemäß in Mengen von 10 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 15 bis 40 Gew.-%, insbesondere 20 bis 35 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse der Wirkstoffzubereitung.

Vorteilhaft werden den Proteinen zur mechanischen Stabilisierung Weichmacher wie Zucker und/oder Zuckeralkohole wie Saccharose, Glucose, Sorbit, Sorbose, Mannit oder Polyole wie Glycerin zugesetzt.

Die erfindungsgemäßen vernetzenden Enzyme sind ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen (bevorzugt E.C.-Klasse 5.3.4), Phenoloxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.14.) und Peroxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.11), Lysyloxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.4.3), Proteindisulfidreduktasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.6.4), Tyrosinoxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.14) oder Sulfhydryloxidasen (bevorzugt E.C.-Klasse 1.8.). Diese können tierischen, pflanzlichen oder mikrobiellen Ursprungs sein. Bevorzugt sind sie mikrobiellen Ursprungs, das heißt aus Eukaryonten wie Pilzen oder Hefen oder Prokaryonten wie grampositiven oder gram-negativen Bakterien oder Archaeobakterien. Bevorzugt werden als Enzym die Lysyloxidasen verschiedenen Ursprungs verwendet. Besonders bevorzugt werden die Lysyloxidasen aus Hefen wie aus den Gattungen *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Sporobolomyces*, *Sporopachydermia*, oder *Trigonopsis* verwendet. Ganz besonders bevorzugt sind Lysyloxidasen aus den Gattungen und Arten *Candida nagoyaensis*, *Candida nemodendra*, *Candida boidinii*, *Candida lipolytica*, *Candida steatolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Hansenula minuta*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pinus*, *Pichia pastoris*, *Sporobolomyces albo-rubescens*, *Sporopachydermia cereana* oder *Trigonopsis variabilis*. Herausragend geeignet für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Lysyloxidase aus der Gattung und Art *Pichia pastoris*.

Die erfindungsgemäße Lysyloxidase von *Pichia pastoris* läßt sich aus der Zellmasse von *Pichia pastoris* Zellen über einen Zellaufschluß, der mit üblichen Methoden durchgeführt wurde, einer Ionenaustauschchromatographie mit einer anschließenden Molekularsiebchromatographie und abschließender nochmaliger Ionenaustauschchromatographie aufreinen. Mit diesem Reinigungsschema konnte die Lysyloxidase mit einer Reinheit von über 90%, bevorzugt von über 95%, besonders bevorzugt von über 99% dargestellt werden.

Die aufgereinigte Lysyloxidase wurde einer Proteinsequenzierung nach Edman unterzogen. Dabei wurde das N-terminale Ende sowie verschiedene Peptide, die in einem Verdau mit Trypsin erhalten wurden, bestimmt (siehe Beispiel 5).

Die Erfindung betrifft damit ein isoliertes Protein, das mindestens eine der folgenden Sequenzen enthält:

eine aminoterminal Sequenz

G(S)(C)Q(C)KTNEKVNIAPKPNI(C)DT(L)(S)

oder Teilsequenzen, die Peptiden des Proteins entsprechen, die nach einem Verdau mit Trypsin erhalten wurden:

EYP(C)APGVVYNTK
GGTYSTVTQNPTLNR
DYNIMPGGGXVHR
ATGGTYSTVXAQN
APETENNR
GPL(P)VNE(E)TITEPLSFYNT
IYELSLQELIAEYGSDDPNQHTFYSID
DNVDDLSCITIQR
VAPETENCAR

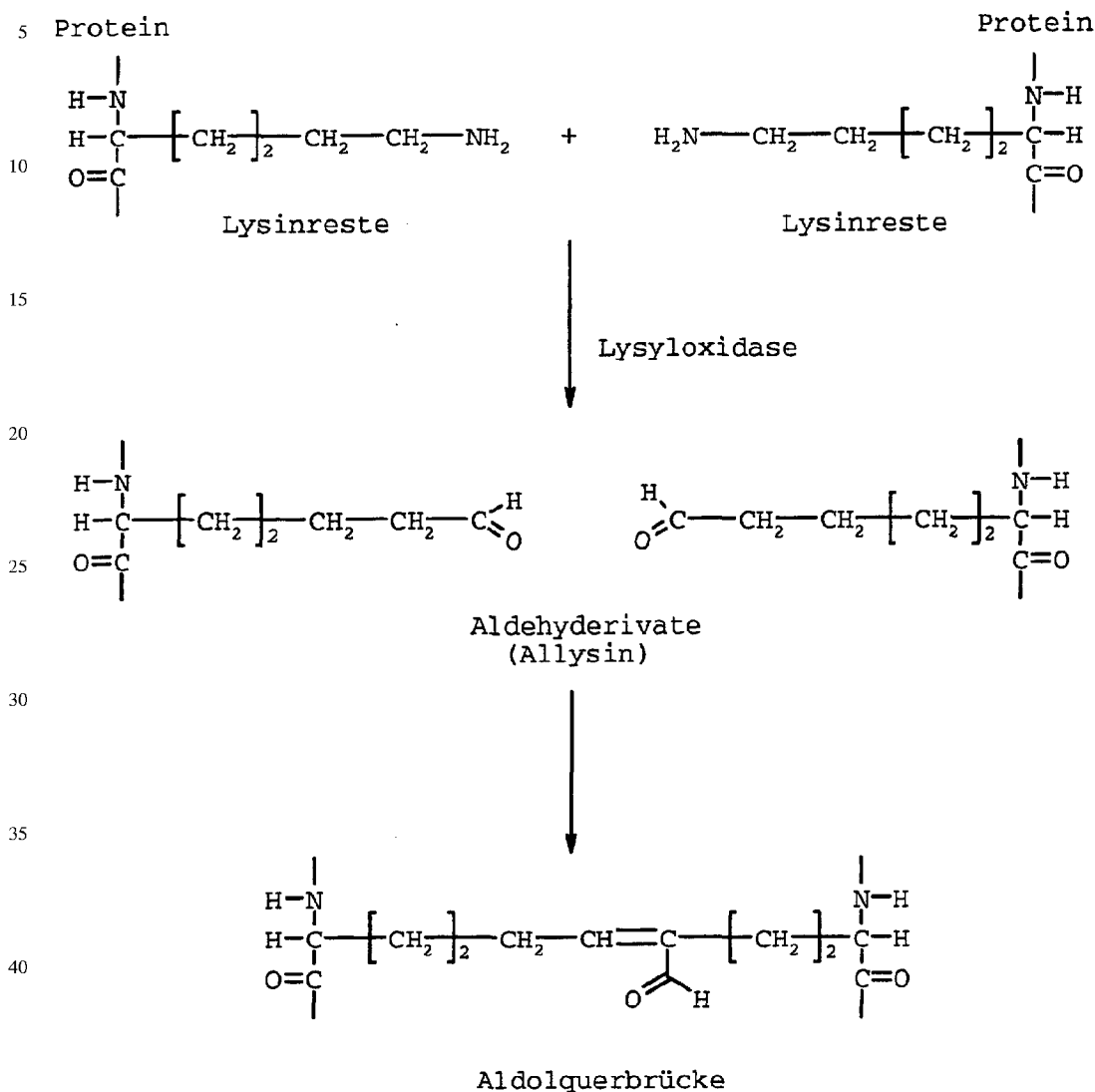
NVDVEYPCAPGVVYNTK
GYPNAEY(S)LDF/ER

und das die ϵ -Aminogruppen des Lysins speziell in einem Protein zu Aldehydgruppen oxidieren kann. Die Buchstaben und Zeichen in den oben genannten Sequenzen haben folgende Bedeutung: X ist eine unbekannte Aminosäure, die an dieser Position nicht identifiziert werden konnte, die Klammern bedeuten nicht eindeutig ermittelbare Aminosäuren, wobei die angegebenen Aminosäure, die wahrscheinlich richtige Aminosäure ist, der Schrägstrich bedeutet Aminosäurealternativen, wobei die Aminosäure vor dem Schrägstrich oder die nach dem Schrägstrich an der Position richtig sein kann. Durch die Oxidation der ϵ -Aminogruppen kommt es schließlich zur Quervernetzung von Proteinen, wobei Bereiche desselben Proteins miteinander vernetzt werden können oder verschiedener Proteine.

Die Lysyloxidase (= PROTEIN-LYSINE 6-OXIDASE, EC 1.4.3.13 oder LYSYL OXIDASE) speziell die Lysyloxidase von *Pichia pastoris* ermöglicht die enzymatische Quervernetzung von Proteinen, wobei als Protein vorteilhaft Gelatine verwendet wird. Dabei werden die ϵ -Aminogruppen der Lysine zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese Aldehyde können dann unter Bildung Schiff'scher Basen mit den Aminogruppen anderen Lysine oder anderen freien Aminogruppen beispielsweise Aminoazuckern reagieren. Ein besonderer technischer Vorteil für den Anwender ist die zeitliche Trennung innerhalb der gesamten Reaktionssequenz, das heißt, die Bildung der Aldehyde aus den ϵ -Aminogruppen der Lysine und die Reaktion der Aminogruppen mit den gebildeten Aldehydgruppen ist zeitlich getrennt. Dies bietet gegenüber beispielsweise der enzymatischen Quervernetzung mit Hilfe der Transglutaminase einen wesentlichen Fortschritt, da bei dieser Reaktion immer sofort die Vernetzung erfolgt und damit keine zeitliche Trennung in der Enzymreaktion und der Vernetzung möglich ist. Diese zeitliche Trennung ermöglicht die vorteilhafte Verwendung der enzymatischen Reaktion für Verfahren wie zum Beispiel die Herstellung von Wirkstoffzubereitungen über Sprühtrocknung oder über das sogenannte Mikronisierungsverfahren (siehe EP-A-0 065193). Ein weiterer Vorteil ist die Unbedenklichkeit der gebildeten Moleküle, da sie ein natürlicher Bestandteil des Bindegewebes sind (**Abb. 1 und 2**). Sie werden dort von einer Gewebe-Lysinoxidase erzeugt.

Abb. 1

Bildung einer Aldolquerbrücke aus zwei Lysinseitenketten



Die genannten Enzyme können in Form der gereinigten Enzyme oder in Form von Rohextrakten aus natürlichen Quellen wie aus Eukaryonten wie Pilzen, Hefen, tierischen oder pflanzlichen Zellen oder Prokaryonten wie gram-positiven, gram-negativen Bakterien oder Archaeobakterien verwendet werden. Auch ganze Organismen oder Zellen können für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, soweit die Enzyme ins extrazelluläre Milieu sezerniert werden oder die Zellen permeabilisiert wurden. Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren mit gereinigten Enzymen oder, soweit keine unerwünschten Nebenaktivitäten vorhanden sind, mit Rohextrakten durchgeführt.

Die für die Quervernetzung der Proteine benötigten Enzymmengen bzw. -aktivitäten lassen sich in herkömmlicher Weise in dem Fachmann bekannter Art durch einfache Vorversuche bestimmen. Üblicherweise werden die Enzyme in einer Menge zugesetzt, daß 20 bis 100% der quervernetzbaaren Gruppen beispielsweise der Lysinreste im Protein vernetzt werden. Vorteilhafterweise werden 0,001 bis 1000 Units Enzym pro Gramm Protein, vorzugsweise 0,01 bis 100 Units Enzym pro Gramm Protein, besonders bevorzugt 0,1 bis 10 Units pro Gramm Protein zugesetzt.

Die Wirkstoffzubereitungen können einen oder mehrere Wirkstoffe enthalten, wobei unterschiedliche Wirkstoffklassen wie Vitamine oder Carotinoide oder mehrere Wirkstoffe einer Wirkstoffklasse beispielsweise mehrere verschiedene Carotinoide oder Vitamine oder deren Mischungen in den Zubereitungen enthalten sein können.

Die Wirkstoffe in den Zubereitungen können von einer oder mehreren Schichten umgeben sein. Diese Schichten können aus einer oder mehreren erfindungsgemäß quervernetzten Proteinschichten oder aus einer oder mehreren erfindungsgemäß quervernetzten Proteinschichten und mindestens einer chemisch quervernetzten Proteinschicht und/oder weiteren Schichten aus natürlichen oder künstlichen Polymeren bestehen. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren quervernetzten Proteine können auch Teile mindestens einer den oder die Wirkstoffe umgebenden Schicht sein.

Unter natürlichen und/oder künstlichen Polymeren sind prinzipiell alle Polymere denkbar, die für die Formulierung von Wirkstoffen geeignet sind. Als natürlichen Proteine seien beispielsweise Polymere wie Guar Gum, Alginate, Carrageenan, Pektine oder Polymere auf Basis von Mannose und/oder Galaktose genannt. Als künstliche Proteine seien beispielsweise Polymere auf Basis von Acrylsäure, Methacrylsäure, Acrylaten, Methacrylaten oder Mischungen aus die-

sen Monomeren wie beispielsweise Eudragit L30D-55 (Methacrylsäure : Ethylacrylat, 1 : 1) oder Eudragit S (Methacrylsäure : Methylmethacrylat, 1 : 2). Auch andere Monomere können in den Polymeren enthalten sein beispielsweise Monomere, die eine positive Ladung mitbringen wie Trimethylammonioethylmethacrylat, Polylysin oder Polyallylamin. Je nach verwendetem Polymer oder Polymergemisch lassen sich mit Hilfe der erfindungsgemäßen Schichten herstellen, die es vorteilhaft ermöglichen den oder die Wirkstoffe so zu formulieren, daß sie gezielt am Wirkort freigesetzt werden können. So lassen sich Schichten erzeugen die beispielsweise Magensaft-resistent sind, die sich im Darm auflösen, die sich gezielt im Magen auflösen, die durch das Pansenmieu nicht aufgelöst werden oder die bei Verbringung in den Körper den Wirkstoff erst nach einiger Zeit freigegeben. In Futter- oder Nahrungsmitteln kann der Wirkstoff so formuliert werden, daß er erst nach Aufnahme der Wirkstoffzubereitung in den Körper freigesetzt wird. 5

Vorteilhaft wird der Wirkstoff oder die Wirkstoffe von einer oder mehreren über das erfindungsgemäße Verfahren quervernetzten Proteinschichten umgeben. 10

Die die Wirkstoffzubereitungen enthaltenden Emulsionen werden vorteilhaft unter Verwendung von hydrophoben Trennmitteln wie hydrophobe Kieselsäure, natürliche Stärke, wie z. B. Maisstärke, hydrophobierte Stärkederivate, wie z. B. hydrophobierte Maisstärke, Salzen von langkettigen Fettsäuren oder Gemischen aus diesen Stoffen versprüht. Das Trennmittel kann aber auch in der Sprühkammer z. B. als hydrophobe Kieselsäurepartikel in Luft oder Inertgas (z. B. Stickstoff) vorgelegt werden. Anschließend erfolgt die Trocknung der versprühten Partikel gegebenenfalls nach Abtrennung der Trennmittel, gegebenenfalls unter leichter Erwärmung bis 80°C, bevorzugt bis 60°C, besonders bevorzugt bei Raumtemperatur, durch Behandlung in einem Luft- oder Schutzgasstrom. 15

Zusätzlich zu den obligatorischen Bestandteilen werden der Dispersion mit Vorteil noch andere, bei der Herstellung von Wirkstofftrockenpulvern übliche Verbindungen, zugefügt. 20

25

30

35

40

45

50

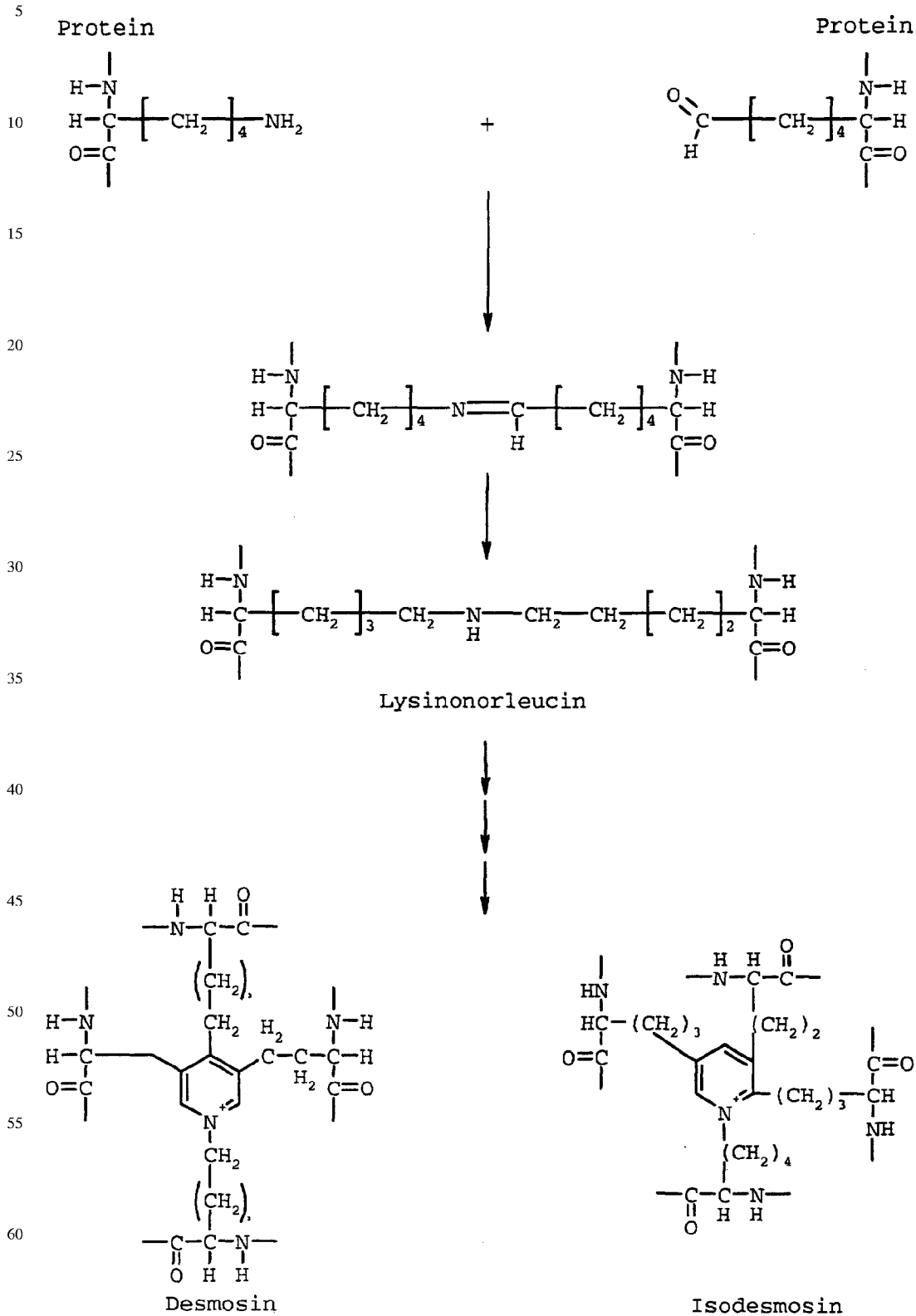
55

60

65

Abb. 2

Reaktion der Lysinreste mit Allysins zur Schiff'schen Base und weitere Reaktion zu Lysinonorleucin, Desmosin und Iso-desmosin



Von besonderer Bedeutung für einen Einsatz der Trockenpulver als Futtermittelzusatz ist bei oxidationsempfindlichen Wirkstoffen ein Zusatz von Antioxidantien, wie Ethoxyquin, butyliertes Hydroxytoluol (BHT), butyliertes Hydroxyanisol (BHA) oder Tocopherol, sowie Stabilisatoren, wie Ascorbylpalmitat, Mono- und Diglyceride, Ester von Monoglyceriden mit Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Diacetylweinsäure, Polyglycerinfettsäureester, Sorbitanfettsäureester,

Propylenglykolfettsäureester, Stearoyl-2-Lactylat, Phosphorsäure oder Phytinsäure und deren Alkali- oder Erdalkalisalze, oder aber Komplexbildner, wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA).

Häufig werden der Emulsion aber auch Feuchthaltemittel, wie Glycerin, Sorbitol, Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglykole oder auch zusätzliche Emulgatoren, wie Lecithin, zugefügt.

Darüberhinaus haben sich Zusätze wie Kohlenhydrate wie Zucker, Stärke oder Stärkederivate insbesondere Maisstärke oder Maltodextrin oder Dickungsmittel, wie Gummiarabicum, Guargummi, Traganth, AgarAgar, Carrageenan, Locust-Bean-Gum, Alginate, Pektine, Xanthan, Curdlan und bestimmte abgebaute Stärken zur Einstellung der Viskosität der Emulsion als nützlich erwiesen.

Bezüglich näherer Details über Bedeutung, Art und Menge solcher Zusätze verweisen wir auf entsprechende Fachliteratur, beispielsweise auf die obengenannte Monographie "Fat-soluble Vitamins", Vol. 9, insbesondere Seiten 128 bis 133.

Durch diese Zusätze werden die Wirkstoffzubereitungen vorteilhaft stabilisiert und an die besonderen Darreichungsbedingungen angepaßt.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geht man beispielsweise so vor, daß man zur Herstellung der die Wirkstoffe enthaltenden Dispersion Gelatine in heißem Wasser (von 50 bis 70°C) zur Lösung bringt, zu dieser Lösung die Zucker, die Aminoverbindungen, die Vitamine und/oder Carotinoide, Stabilisatoren und die anderen üblichen Zusatzstoffe sowie ggf. noch zusätzlich Wasser addiert und das Ganze durch kräftiges Rühren bei erhöhter Temperatur dispergiert. Für die im letzten Verarbeitungsschritt erfolgende enzymatische Vernetzung des Pulvers sollte die fertige Dispersion in einem pH-Bereich von 4 bis 10 vorliegen, welcher durch Zugabe von Basen, wie NaOH, KOH, Ca(OH)₂, MgO, Soda oder NH₄OH oder durch Zugabe von basisch reagierenden Salzen wie Natriumacetat oder Na₂HPO₄ eingestellt werden kann. Die so hergestellte Dispersion kann nach üblichen Methoden in ein trockenes Pulver überführt werden beispielsweise durch Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder sonstige übliche Trocknungsmethoden.

Weitere Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise die Verwendung der enzymatischen Quervernetzung bei den unterschiedlichen Mikronisierungsverfahren.

In EP-B-0 065 193 wird beispielsweise ein Verfahren zur Herstellung von sehr feinverteilten freifließenden Pulvern der Carotinoide beschrieben, wobei das Carotinoid in einem flüchtigen, mit Wasser mischbaren organischem Lösungsmittel bei Temperaturen zwischen 50°C und 200°C, gegebenenfalls unter erhöhtem Druck, innerhalb einer Zeit von weniger als 10 Sekunden gelöst wird und anschließend die so erhaltene molekular-disperse Lösung sofort durch schnelles Mischen mit einer wäßrigen Lösung eines quellbaren Kolloids bei Temperaturen zwischen 0°C und 50°C der Wirkstoff in kolloiddisperser Form ausfällt. Die Dispersion wird anschließend vom Lösungsmittel und dem Dispergiemedium in üblicher Weise befreit. Als quellbare Kolloide werden Proteine verwendet. Diese können durch Zugabe der oben genannten Enzyme im erfindungsgemäßen Verfahren quervernetzt werden. Vorteilhafterweise werden die Enzyme der wäßrigen Mikronisatlösung vor dem Trocknungsschritt zugesetzt, damit genügend reaktive Gruppen für die Vernetzung hergestellt werden, bevor die Trocknung erfolgt. Weitere Angaben zum Verfahren sind EP-B-0 065 193 zu entnehmen.

EP-B-0 410 236 beschreibt ein weiteres Verfahren zur Herstellung einer kolloid-dispersen Carotinoidpräparation, wobei eine Suspension eines Carotinoides in einem hochsiedenden Öl während einer Zeitdauer von höchstens 30 Sekunden mit überhitztem Wasserdampf in Kontakt gebracht wird. Anstelle des Öls für das Lösen der Carotinoide können auch organische Lösungsmittel wie Chloroform, Methylenchlorid, Tetrachlorkohlenstoff oder Trichlorethylen verwendet werden (siehe DE/OS 12 11 911). Anschließend wird das erhaltene Gemisch mit einer wäßrigen Lösung eines Schutzkolloids emulgiert und die Emulsion danach versprüht und getrocknet. Auch hier werden als Schutzkolloide Proteine verwendet, die im erfindungsgemäßen Verfahren über die Zugabe der genannten Enzyme vor dem Vermischen und Versprühen quervernetzt werden können. Weitere Angaben zum Verfahren sind EP-B-0 410 236 zu entnehmen.

EP-B-0 498 824 beschreibt ein zusätzliches vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von mikrodispersen Wirkstoffzubereitungen. Dabei wird als Wirkstoff ein Carotinoid in Gegenwart eines Schutzkolloides beispielsweise eines Proteins wie Gelatine gemahlen und die gebildete Suspension anschließend getrocknet.

Durch Zusatz der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Enzyme lassen sich die Proteine vorteilhaft vernetzen und die Wirkstoffzubereitung stabilisieren. Nähere Angaben zum Herstellungsverfahren sind der genannten Patentschrift und WO 94/19411 zu entnehmen.

Die anschließende Weiterverarbeitung der Dispersion zu den erfindungsgemäßen Pulvern kann nach allen literaturbekannten Verfahren erfolgen.

Wegen der gewünschten Kornverteilung der Pulver (0,1 bis 0,6 mm Durchmesser) werden solche Verfahren bevorzugt, bei denen Vorkehrungen getroffen werden, daß die gelierten Tröpfchen der Dispersion voneinander getrennt bleiben, bis sich ihre Form stabilisiert hat.

Genannt seien beispielsweise das Verfahren gemäß EP-B1-74050, bei dem die Dispersion in hydrophobe Kieselsäure oder ein Metallsalz einer höheren Fettsäure versprüht wird oder aber das Verfahren gemäß EP-B1 285 682, bei dem die Dispersion in Stärkepulver versprüht wird. Es hat sich erwiesen, daß insbesondere bei Verfahren, die für Zubereitungen mit Gelatine-Gehalten unter 35 Gew.-% eingesetzt werden, die Versprühung mit hydrophobierten Kieselsäuren als Pulvermittel besonders vorteilhaft durchführbar ist.

Die nach den beschriebenen Verfahren erzeugten Pulver besitzen nach dem Trocknen einen Wassergehalt von weniger als 10%, normalerweise weniger als 6%. Die so erhaltenen pulverförmigen Präparate bestehen aus Teilchen mit gut ausgebildeter Oberfläche. Sie lösen sich in warmem Wasser von ca. 40°C rasch zu einer milchigen Dispersion.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitungen eignen sich vorteilhaft zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, sowie zur Herstellung von Lebensmittel und Futtermittel.

Beispiele

Beispiel 1

5 Herstellung der Lysyloxidase mit *Pichia pastoris* – Lu 583 –

Der Stamm wurde auf YM-Agar kultiviert:

10 3 g/l Malt Extract Difco
5 g/l Pepton Difco
3 g/l Yeast Extract Difco
20 g/l Agar Difco

15 Die Platten wurden bei 28°C für 48 h bebrütet und sind danach bei 45°C für mindestens 4 Wochen haltbar.

Vorkultur und Fermentationsmedium

10 g/l Glucose (30 min. bei 121°C autoklavieren)
20 separat ansetzen und 30 min bei 121°C autoklavieren:

0.2 g/l Magnesiumsulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$
3.0 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
0.2 ml/l Salzlösung nach Vishniac & Santer*

25 separat ansetzen und sterilfiltrieren:

10 ml/l Vitaminlösung nach Lodder**

30 Die Mediumsbestandteile werden nach der Sterilisation vereinigt.

* Rezeptur der Salzlösung. Nach Vishniac & Santer

50 g/l Titriplex III
35 22 g/l Zinksulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$
5.54 g/l Calciumchlorid
5.06 g/l Manganchlorid $\times 4 \text{ H}_2\text{O}$
4.99 g/l Eisensulfat $\times 7 \text{ H}_2\text{O}$
1.1 g/l Ammoniumheptamolybdat $\times 4 \text{ H}_2\text{O}$
40 1.57 g/l Kupfersulfat $\times 5 \text{ H}_2\text{O}$
1.61 g/l Cobaltchlorid $\times 6 \text{ H}_2\text{O}$

mit KOH auf pH 6.0 einstellen

45 *** Rezeptur der Vitaminlösung nach Lodder

20 µg/l Biotin
20 000 µg/l Ca-pantothenat
2 µg/l Folsäure
50 10 000 µg/l Inositol
200 µg/l p-Aminobenzoesäure
400 µg/l Niacin (Nicotinsäure)
400 µg/l Pyridoxinhydrochlorid
200 µg/l Riboflavin
55 400 µg/l Thiaminhydrochlorid

Vorkultur

60 Für einen 10 l-Fermenter wurden $2 \times 250 \text{ ml}$ Vorkultur (= VK) im 1 l-Erlenmeyerkolben (= EMK) mit jeweils 3–4 Platinösen Lu 583 beimpft und 24 h bei 28°C und 200 Upm inkubiert.

Hauptkultur

Ansatz im 10 l-Infors-Fermenter mit folgenden Bedingungen:

65 Temperatur: 28°C
Belüftung: 5 l/min. über Ringbegasung
Drehzahl: 400 Upm.

Fermenterbestückung: 3 × Standardrührblätter sowie eingebaute Wellenbrecher

Vor dem Start der Fermentation wurde durch die Zugabe von 50%iger (V/V) n-Butylaminlösung in Wasser der pH auf ca. 7,0 eingestellt. Anschließend wurde der Fermenter mit 2 × 250 ml Vorkultur beimpft. Die Fermentationsdauer betrug etwa 28–30 h. Der Zeitpunkt des Fermentationsendes wurde über die Bestimmung der OD bei 600 nm festgelegt. Die OD 600 der Fermenterproben wurde dabei gegen Luft gemessen und sollte bei 0,9–1,0 liegen. Bei höherer OD nimmt die Aktivität des Enzyms schnell ab. 5

Aufarbeitung

Der Fermenterinhalt wurde in einer Hereaus Cryofuge 8000 bei 45°C und 5000 Upm (entspricht ca. 9500 × g) 20 min. zentrifugiert. Die gesamte Biofeuchtmasse wurde in 250 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellmasse kann bei –15°C im Tiefkühlschrank gelagert werden. 10

Zellaufschluß und Messung der Lysyloxidase

Die Biofeuchtmasse (100 ml) wurde mit 100 ml Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) in der Kugelmühle unter Eiskühlung 30 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zerkleinert. Das Homogenat wurde über Gaze filtriert und dann für 10 Minuten bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Aktivität des Überstandes wurde durch einen HPLC-Test ermittelt. Die Lysyloxidase wandelt Benzylamin in Benzaldehyd um (Detektion bei 250 nm). Die Menge an entstandenem Benzaldehyd wurde über eine Eichkurve ermittelt. 20

Laufbedingungen

Puffer A: Wasser, 0,1% TFA 25
Puffer B: Acetonitril, 0,1% TFA

0 Minuten 40% B
6 Minuten 70% B
6,1 Minuten 100% B 30
6,5 Minuten 100% B
Fluß 1 ml/min
6,5–9 min zurück auf 40% B, Fluß 1,5 ml/min

Die Lysyloxidase enthaltenden Überstände von 7 × 10 l Fermentern wurden gesammelt und vereinigt. Es ergab sich eine Aktivität von 125,5 U/l in 1, 8 l. 35

Beispiel 2

Markierung der Gelatine mit Fluoreszenzfarbstoffen und Quervernetzung der Gelatine durch die Lysyloxidase 40

Gelatine (10 g) wurde in 50 mM Natriumboratpuffer pH 9,0 gelöst. Der pH wurde kontrolliert und mit 0,5 M NaHCO₃ nachgestellt. Die Fluoreszenzfarbstoffe Cy-5 oder Bodipy 630/650-X, SE) wurden in 5 ml DMSO (= Dimethylsulfoxid) gelöst und in einem Gewichtsverhältnis von 1 : 100 den Proteinen zugesetzt. Während 16 Stunden bei Raumtemperatur reagierten die Succinimidylester der Farbstoffe mit den freien Aminogruppen der Proteine. Die Reaktionsansätze wurden dann 5 mal gegen große Volumina 20 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,01% Azid dialysiert und bei –20 Grad Celsius als 1%ige Proteinlösung gelagert. 45

In einem 4 l-Rührkolben wurden in 1800 ml einer Lösung, bestehend aus vereinigten Überständen von Lysyloxidase-Fermentationslösungen (ZH 29303/5; 125,5 U/l) bei 40°C 454 g Gelatine A 100 Bloom durch Rühren in Lösung gebracht. Dazu wurde mit Bodipy dotierte Gelatine (siehe oben) gegeben. Der gesamte Ansatz wurde 48 h bei 40°C gerührt, wobei der Kolben nicht geschlossen wurde, um einen dauernden Luftzutritt und damit den Zutritt von Sauerstoff zu ermöglichen. 50

Es wurden aus der Lösung in den angegebenen zeitlichen Abständen Proben à 300 g entnommen:

Probe 1: sofort nach Beginn des Versuchs 55
Probe 2: nach 2 Std.
Probe 3: nach 5 Std.
Probe 4: nach 24 Std.
Probe 5: nach 29 Std.
Probe 6: nach 48 Std. 60

Die Proben wurden wie folgt aufgearbeitet:

- 200 g wurden mit einer Einstoffdüse direkt in eine Wolke aus hydrophobierter Kieselsäure (Sipernat D 17) zu Partikeln von ca. 200 µm Durchmesser versprüht. Das erhaltene feuchte Produkt wurde geteilt; eine Hälfte wurde bei Raumtemperatur und die andere bei 80°C jeweils auf einer Nutsche im Luftstrom getrocknet. 65
- Die restlichen 100 g wurden nach Zusatz von Vitamin A, Isosweet und Maisstärke nach Einemulgierung der Öl-Phase mit einem Ultraturrax-Gerät in gleicher Weise versprüht und durch Trocknung des Sprühproduktes bei Raum-

temperatur in ein Trockenpulver umgewandelt. Diese Produkte hatten etwa folgende Zusammensetzung:

25% Vitamin A-Acetat stab. mit Ethoxyquin und BHT
 30% Gelatine A 100 Bloom
 25% Maisstärke
 15% Isosweet
 Rest: Wasser + Sipernat D 17 + Reste aus Fermentationsrückstand

Beispiel 3

Messung der Quervernetzung durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (= FCS)

Die FCS ist eine Methode, die auf der Anzahlfluktuations-Spektroskopie beruht. Mit der FCS können Diffusionskoeffizienten und Anzahlkonzentrationen fluoreszierender Moleküle in hochverdünnter Lösung gemessen werden. Die **Fig. 1** und 2 zeigen den Aufbau einer FCS-Apparatur und ihr Funktionsprinzip. Dabei wird ein Laserstrahl über ein Mikroskopobjektiv in ein sehr kleines Volumen einer flüssigen Probe fokussiert und die darin angeregte Fluoreszenz gemessen.

Fig. 1 zeigt eine FCS-Apparatur. Der fokussierte Laserstrahl und die konfokalen Blenden definieren ein sehr kleines Beobachtungsvolumen (das konfokale Volumen) in der Probe. Die zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenz aus diesem Volumen werden mit einem Korrelator analysiert.

Fig. 2: (= Anzahlfluktuationen im Beobachtungsvolumen führen zu Fluktuationen des FCS-Signals $I(t)$). Aus der Autokorrelationsfunktion $G(t)$ des FCS-Signals können die mittlere Verweilzeit τ (= mittlere Zeit für die Diffusion eines Teilchens durch das Beobachtungsvolumen) und die Zahl der Moleküle N im Meßvolumen abgelesen werden. τ ist direkt proportional zur Größe der fluoreszierenden Moleküle.

Das Volumen ist dabei so klein, daß sich darin im Mittel nur wenige Teilchen befinden. Die Teilchenzahl im Volumen schwankt durch Diffusion ständig um einen mittleren Wert N . Damit schwankt auch die Fluoreszenzintensität $I(t)$ um einen mittleren Wert I_m . Aus den Schwankungen der Fluoreszenz lassen sich die Diffusionszeit τ (proportional zur Molekülgröße) und die Anzahlkonzentration der fluoreszierenden Moleküle berechnet (siehe **Fig. 1**).

Bestimmung der Molekulargewichte durch Gel-Permeations-Chromatographie (GPC)

Die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung (MGV) erfolgte mittels GPC. Die wichtigsten Versuchsparameter:

Säule: TSK Gel, 4000 SWXL, 250 · 4 mm
 Laufmittel: 0,01 M NaH_2PO_4 , 0,1 M Na_2SO_4 , 1% SDS
 pH: 5,3
 Temperatur: 30°C
 Fluß: 0,5 ml/min
 Detektion: UV-Spektrometer, 220 nm

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils ca. 0,5 g Substanz in 100 ml Laufmittel für 15 min bei $T = 60^\circ\text{C}$ gerührt. Die so erhaltene trübe Lösung wurde durch einen 0,2 μm -Filter filtriert und anschließend in die Probenschleife des GPC-Gerätes injiziert (ca. 20 μl). Nicht wasserlösliche Gelatine-Bestandteile konnten nicht detektiert werden.

Als direkte Meßgröße erhielt man bei dieser Methode das Intensitätssignal des Detektors (Maß für die Konzentration) als Funktion der Elutionszeit. Bei der GPC wurden die Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius r_H getrennt. Moleküle mit großem r_H werden dabei schneller eluiert als Moleküle mit kleinem r_H .

Über eine Kalibrierung mit Standard-Polymeren (hier: Pullulstandards) konnte aus den Elutionsdiagrammen MGV berechnet werden [siehe M. D. Lechner, K. Gehrke und E. H. Nordmeier, in: "Makromolekulare Chemie", Kapitel 4.3.6.1., Birkhäuser Verlag (1996)]. Zwischen der Elutionszeit t_E und der Molmasse M der Pullulstandards gilt in erster Näherung folgende Proportionalität:

$$t_E \propto \log(M) \quad (1)$$

Exakter lassen sich bei einer Auftragung von t_E vs. $\log(M)$ die Daten jedoch mit einem Polynom dritten Grades beschreiben. Aus der Inversen dieses Polynoms können aus den Gelatine-Elutionszeiten Gelatine-Molekulargewichte berechnet werden. Die so erhaltenen Molekulargewichte sind somit keine absoluten Gelatine-Molekulargewichte (wie sie z. B. aus der LS erhalten werden können), sondern lediglich relative Molekulargewichte (bezogen auf die hier verwendeten Standards). Weiterhin ist zu beachten, daß aufgrund der zur Verfügung stehenden Pullulstandards die Elutogramme nur im Bereich von 12 min $< t < 25$ min ($\equiv 10^3 \text{ g/mol} < MG < 10^7 \text{ g/mol}$) sinnvoll in die entsprechenden Molekulargewichte umgerechnet werden können. Annähernd [siehe Gleichung (1)] ist bei einer halblogarithmischen Auftragung (t_E vs. $\log(M)$) die Fläche unter der Kurve der untersuchten Substanzmenge proportional. Die Elutionsdiagramme wurden auf gleiche Gesamtflächen normiert, so daß die Flächen unter den Kurven – und somit die jeweiligen Substanzmengen – direkt miteinander verglichen werden konnten.

Folgende Beobachtungen wurden gemacht: Mit zunehmender Dauer der Inkubation der markierten Gelatine mit der unmarkierten Gelatine und der Lysyloxidase wurde der Wert τ (proportional zur Molekülgröße) bei Messungen durch die FCS immer kleiner und gleichzeitig nahm die Intensität (I_{kaps}) der Fluoreszenz ab (Tabelle 1, **Fig. 3**).

Weiterhin wurde in der GPC mit zunehmender Inkubationszeit eine Abnahme der hochmolekularen Gelatine-Anteile beobachtet (Tabelle 2, **Fig. 4**).

Durch die Inkubation der Gelatine mit Lysyloxidase wurde die Gelatine vernetzt. Diese vernetzten Anteile konnten in Wasser nicht mehr vollständig gelöst werden, sondern lagen als gequollene Gelpartikel vor. Bei der FCS- und GPC-Probenpräparation wurden diese Partikel durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt und konnten nicht mehr detektiert werden.

Mit zunehmender Inkubationszeit der Gelatine verschwanden bevorzugt die hochmolekularen Gelatine-Anteile aus dem Elugramm. Dies bedeutet, daß gerade die hochmolekularen Gelatine Anteile überproportional von der Vernetzung betroffen sind. Aus statistischen Gründen ist dieses Verhalten durchaus sinnvoll. Darüberhinaus konnte aber auch eine molekulargewichtsabhängige Verteilung der Lysingruppen für diesen Befund mit verantwortlich sein.

Die Abnahme von τ durch FCS-Messungen ist als Abnahme des Molekulargewichts zu interpretieren und konnte durch Gel-Permeations-Chromatographie direkt gezeigt werden. Die Abnahme der Intensität ist auf die Abnahme der Anzahl fluoreszenter Teilchen im Überstand der rückgelösten Präparate zurückzuführen. Durch Quervernetzung wurden große Gelatinemoleküle mit höherer Wahrscheinlichkeit betroffen als kleine Moleküle. Außerdem können kleine Moleküle das durch die Wirkung der Lysyloxidase entstandene Netzwerk besser verlassen als unvernetzte, große Gelatinemoleküle, die im unlöslichen Teil zurückbleiben.

Damit konnte gezeigt werden, daß durch die Lysyloxidase eine für eine Quervernetzung ausreichende Zahl von Allylsinen und später Schiff'sche Basen gebildet werden.

Beispiel 4

Nachweis der Quervernetzung durch einen schnellen, parallelisierbaren Test in Mikrotiterplatten

Gelatine wurde mit 1 mM/l N-Hydroxysuccinimid aktiviertem Biotin bei pH 8,4 in einem Boratpuffer markiert und anschließend gegen einen 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mehrfach dialysiert. Die Fähigkeit der so modifizierten Gelatine, Avidin oder Streptavidin zu binden, konnte in Vorversuchen gezeigt werden. 10 und 100 mg/ml Gelatine binden nach Biotin-Modifikation an die mit Avidin modifizierte Oberfläche eines Biacore-Sensorchips. Nicht modifizierte Gelatine wurde nicht an diese Oberfläche gebunden.

Testprinzip und Durchführung

Gelatine wurde an die Oberfläche von Mikrotiterplatten adsorbiert. Danach wurde Biotin-markierte Gelatine und die quervernetzende Substanz/Enzym zugefügt. Adsorbierte Gelatine wurde mit biotinylierter Gelatine vernetzt. Nach einem intensiven Waschschritt wurde die Biotinylierung durch einen Streptavidin-Peroxidase-Komplex nachgewiesen.

0,4 ml einer 1%igen Gelatinelösung in 0,1 M NaHCO₃, pH 9,2 wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur an NUNC MaxiSorp Elisaplatten adsorbiert. Danach wurde dreimal mit PBS, 0,05% Tween 20 Lösung gewaschen.

Danach wurde biotinylierte Gelatine und in verschiedenen Konzentrationen Quervernetzer zugegeben. Dies wurde in einem PBS Puffer mit 5 mM DTT und 0,1% Tween 20 durchgeführt. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für verschiedene Zeiten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Danach wurden die Platte 6 mal gewaschen, um nicht-umgesetztes Material zu entfernen.

Zum Nachweis wurde Streptavidin-Peroxidase der Firma Boehringer 1 : 10 000 in PBS, 0,1% Tween 20 verdünnt und 1 ml pro Well zugegeben. Es wurde erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur (ca. 23°C) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden 0,015 ml Reaktionsgemisch (0,1 ml 42 mM Tetramethylbenzidin in DMSO, 10 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 4,9 mit Zitronensäure eingestellt) zugegeben. Es bildete sich eine blaue Farblösung im Laufe der Reaktion. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten mit 0,1 ml 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die blaue Farbe wurde dabei gelb. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm.

Beispiel 5

Reinigung der Lysyloxidase

Homogenisation

Die Zellen von *Pichia pastoris* (ca. 18 ml) wurden nach Lagerung bei -20 Grad C aufgetaut und mit Puffer A (20 mM Natriumphosphat, 1 mM Ethanolamin, pH 7,0 auf 50 ml verdünnt. Es wurden 50 ml Glasperlen, Durchmesser 0,5 mm, zugegeben und 30 Minuten bei 5000 U/min unter Kühlung durch Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde über Gaze filtriert. Das Filtrat wurde 10 Minuten bei 8000 rpm und 4 Grad C zentrifugiert.

Ionenaustauschchromatographie

Der Überstand wurde mit NaOH auf pH 7,0 erneut eingestellt und auf eine Q-Sepharose aufgetragen (Q-Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Durchmesser 5 cm, Höhe 13 cm, Volumen 250 ml). Nach dem Auftrag (Leitfähigkeit 0,7 mS/cm, 540 ml) wurde mit 600 ml Puffer A gewaschen. Die Säule wurde mit einem linearem Gradient von 1 l Puffer A und 1 l Puffer B (wie Puffer A mit 1 M NaCl) eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt.

Molekularsiebchromatographie

Die Wertfraktion wurde nach Konzentrierung über einen 10 kDa-Omega-Filter auf einer präparativen Superdex-Säule (Pharmacia, Durchmesser 2,6 cm, Länge 60 cm Volumen 320 ml) in 20 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, 1 mM Ethanolamin, pH 7,5 getrennt. Fluß 3 ml/Minute. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt.

Ionenaustauschchromatographie

Die Wertfraktion der Molekularsiebchromatographie wurde erneut durch Chromatographie an einer Mono-Q-Säule gereinigt (Pharmacia, HR5/5). Der Gradient wurde aus Puffer A und Puffer B erzeugt. Flußgeschwindigkeit 1 ml/Minute, 100 Fraktionen zu je 1 ml. Die Lysyloxidase eluierte als aktives Hauptprotein. Das Protein hatte im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 121 000 Da.

Folgende Sequenzen wurden erhalten:

Aminoternale Sequenz

G(S)(C)Q(C)KTNEKVNIEAPKPNI(C)DT(L)(S)

Sequenzen, die Peptiden des Proteins entsprechen, die nach einem Verdau mit Trypsin erhalten wurden:

EYP(C)APGVVYNTK

GGTYSTVTQNPTLNR

DYNIMPGGGXVHR

ATGGTYSTVXAQN

APETENNAR

GPL(P)VNE(E)TITEPLSFYNT

IYELSLQELIAEYGSDDPNNQHTFYSDI

DNVDDLSTIIQR

VAPETENCAR

NVDVEYPCAPGVVYNTK

GYPNAEY(S)LDF/ER

Tabelle 1

Manuelle Messungen						
lfd Nr.	Zeit	Sek.	Beta	N	Tau, μ s	I, kcps
66	0h	61348	0,190	5,3	456,2	220,9
67		61414	0,204	4,9	452,9	211,3
68		61480	0,210	4,8	441,6	206,4
69	0h	61562	0,172	5,8	455,8	240,3
70		61628	0,180	5,6	450,3	230,1
71		61696	0,186	5,4	456,5	226,6
72	2h	61780	0,262	3,8	469,2	164,0
73		61846	0,282	3,5	468,4	155,3
74		61912	0,288	3,5	463,0	152,2
75	2h	62074	0,314	3,2	477,0	139,7
76		62140	0,335	3,0	474,6	133,8
77		62206	0,338	3,0	469,6	129,1
78	24h	62354	0,295	3,4	345,2	153,4
79		62420	0,309	3,2	358,3	147,8
80		62486	0,315	3,2	346,9	145,6
81	24h	62588	0,281	3,6	361,3	159,1
82		62654	0,288	3,5	353,1	153,8
83		62720	0,292	3,4	358,0	153,3
84	29h	62840	0,324	3,1	337,0	138,8
85		62906	0,335	3,0	339,7	133,1
86		62972	0,340	2,9	338,0	131,7
87	29h	63124	0,294	3,4	356,0	151,6
88		63190	0,314	3,2	347,4	141,9
89		63256	0,325	3,1	345,1	139,5
90	48h	63334	0,559	1,8	288,2	84,7
91		63400	0,574	1,7	292,5	83,6
92		63466	0,570	1,8	288,1	83,9
93	48h	63544	0,441	2,3	292,8	104,4
94		63610	0,458	2,2	299,6	102,1
95		63676	0,460	2,2	296,5	100,2
96	Bodipy	63750	4,292	0,2	99,5	9,5
97		63816	4,669	0,2	98,5	8,9
98		63882	4,582	0,2	102,1	8,8

Tabelle 2

Zeit	Probenbezeichnung	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	Polyd. (D)
0 h	63/192-1	35000	149000	4,26
2 h	63/192-2	35000	145000	4,13
24 h	63/192-4	21000	39000	1,86
29 h	63/192-5	20000	35000	1,76
48 h	63/192-6	17000	28000	1,66

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe von mindestens einer Schicht umgeben sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine der den oder die Wirkstoffe umgebenden

Schichten oder Teile dieser Schichten aus einem Protein bestehen, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde.

2. Verfahren zur Herstellung von Wirkstoffzubereitungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Wirkstoffe oder ein oder mehrere mit mindestens einer Schicht umgebende Wirkstoffe in Lösung mit vernetzbarem Protein und Enzym zur Beschichtung gemischt wird, wobei das Gewichtsverhältnis zwischen Wirkstoff und Protein zwischen 1 zu 100 und 5 zu 1 liegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff Vitamine, Enzyme, Lebensmittelzusatzstoffe oder Futtermittelzusatzstoffe verwendet werden.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff hydrophob ist.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein vernetzbares Protein ausgewählt aus der Gruppe Gelatine, Kasein, Sojaprotein, Weizenprotein, Maisprotein oder Kollagen verwendet wird.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein aus Mikroorganismen gewonnenes Enzym verwendet wird.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Quervernetzung mit dem Enzym Lysyloxidase durchgeführt wird.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens einen Wirkstoff mit einer wäßrigen Lösung aus vernetzbarem Protein und Enzym durchmischt und versprüht.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß in einer mit hydrophober Kieselsäure, Maisstärke oder hydrophobierte Maisstärke beladenen Atmosphäre versprüht wird.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirkstoffzubereitung bis zu einer Restfeuchte unter 10 Gew.-% getrocknet wird.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur bei der Herstellung der Wirkstoffzubereitung im Wesentlichen unter 80°C gehalten wird.

12. Wirkstoffzubereitung erhältlich nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 11.

13. Wirkstoffzubereitung enthaltend mindestens eine einen oder mehrere Wirkstoffe umgebende Schicht oder Teile einer Schicht aus einem Protein, das mit einem Enzym ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen quervernetzt wurde.

14. Wirkstoffzubereitung nach Anspruch 13, wobei die Wirkstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe:

Carotinoide

Xanthophylle

Vitamin A

Vitamin E

Vitamin D₃

Vitamin K₁

15. Wirkstoffzubereitung nach Anspruch 13 oder 14, die den 0,025-fachen bis 4-fachen Gewichtsanteil bezüglich Wirkstoff an Trennmittel oder Trennmittelgemischen enthält.

16. Wirkstoffzubereitung nach den Ansprüchen 13 bis 15, wobei der Wirkstoffgehalt in der Wirkstoffzubereitung zwischen 1 bis 75 Gew.-% liegt.

17. Ein isoliertes Protein, das mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthält

G(S)(C)Q(C)KTNEKVNIEAPKPNI(C)DT(L)(S)

EYP(C)APGVVYNTK

GGTYSTVTQNPTLNR

DYNIMPGGGXVHR

ATGGTYSTVXAQN

APETENNAR

GPL(P)VNE(E)TTIEPLSFYNT

IYELSLQELIAEYGSDDPNNQHTFYSDI

DNVDDLSCTHQR

VAPETENCAR

NVDVEYPCAPGVVYNTK

GYPNAEY(S)LDF/ER

und das die ε-Aminogruppen des Lysins zu Aldehydgruppen oxidieren kann.

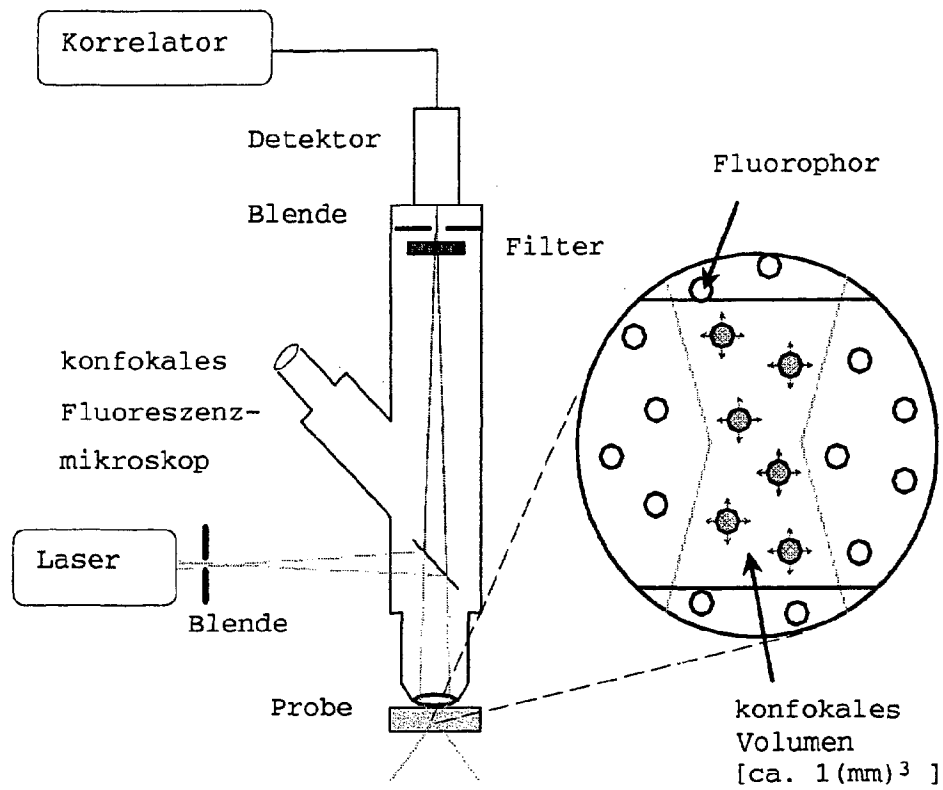
18. Verwendung eines Enzyms ausgewählt aus der Gruppe der Lipoxygenasen, Proteindisulfidomerasen, Phenoloxidasen und Peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen oder Sulfhydryloxidasen zur Formulierung von Wirkstoffzubereitungen.

19. Lebensmittel oder Futtermittel, enthaltend eine Wirkstoffzubereitung nach den Ansprüchen 13 bis 16.

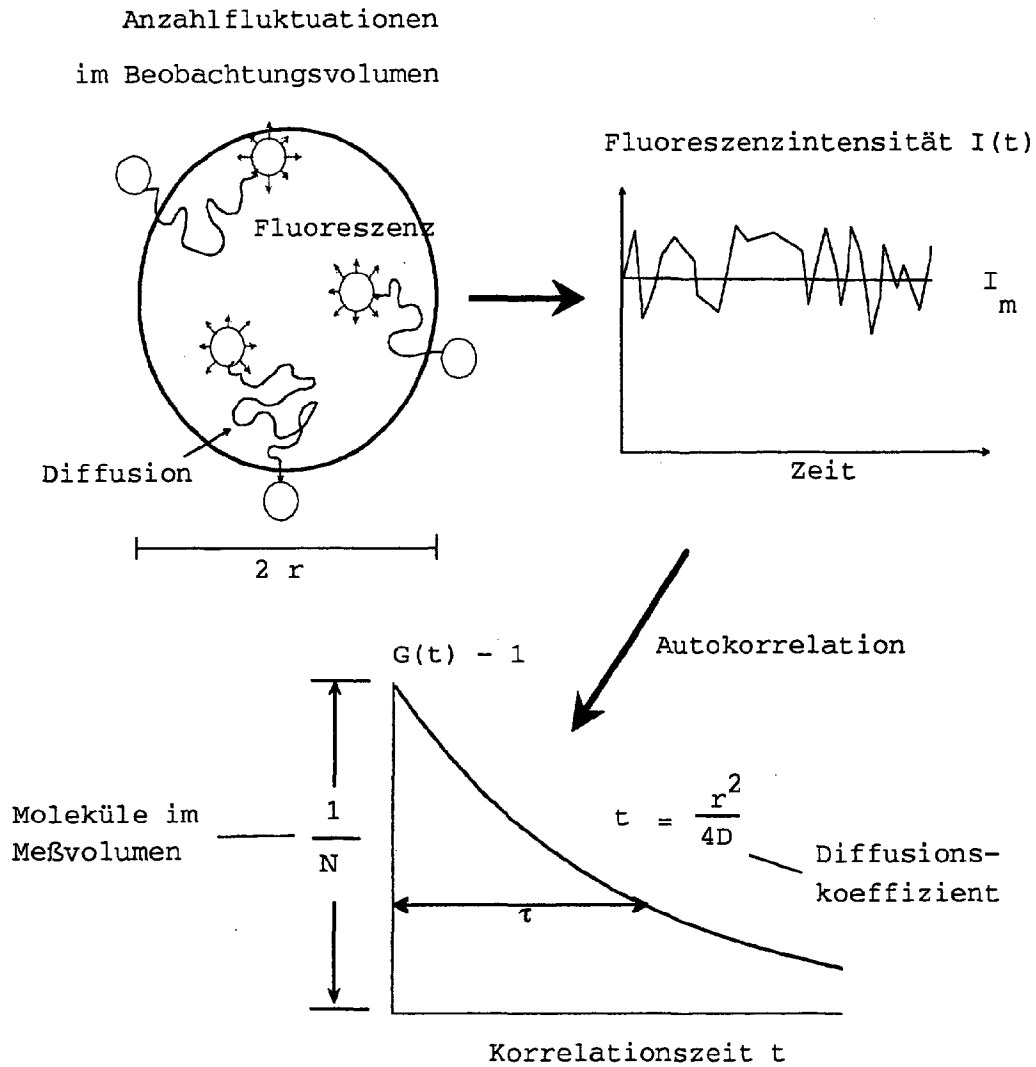
20. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine Wirkstoffzubereitung nach den Ansprüchen 13 bis 16.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

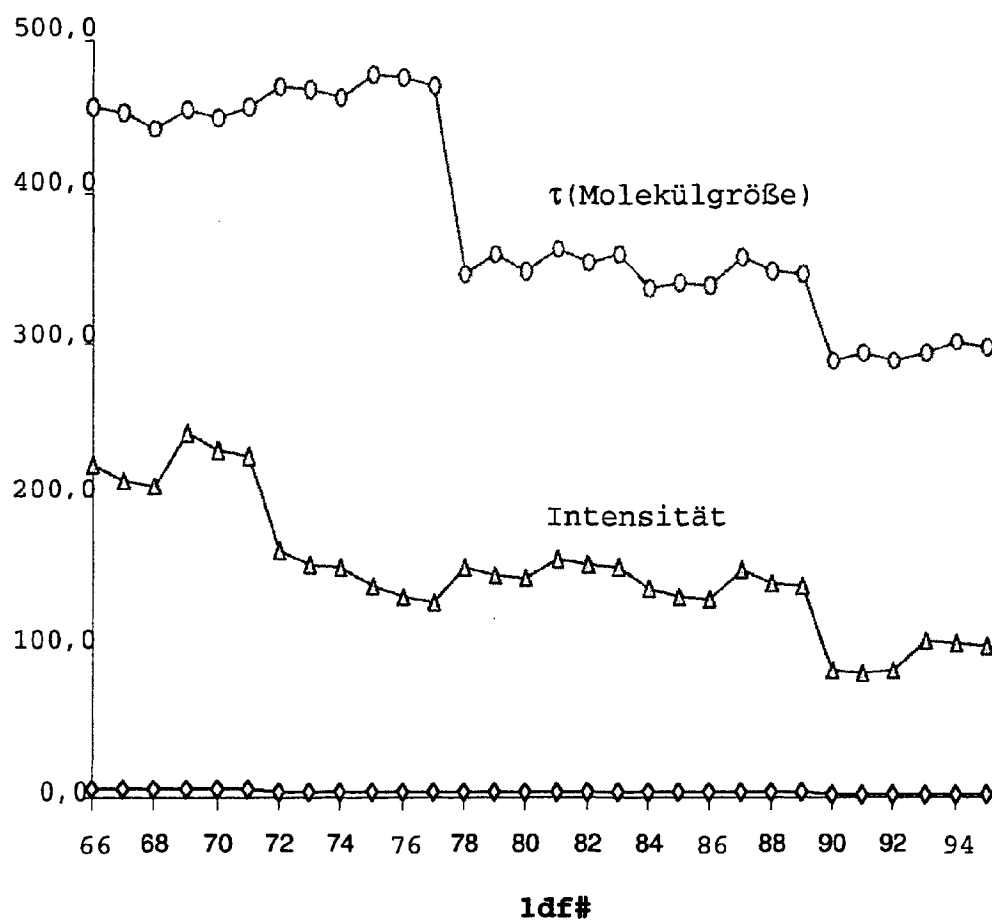
Figur 1: Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (= FCS)



Figur 2

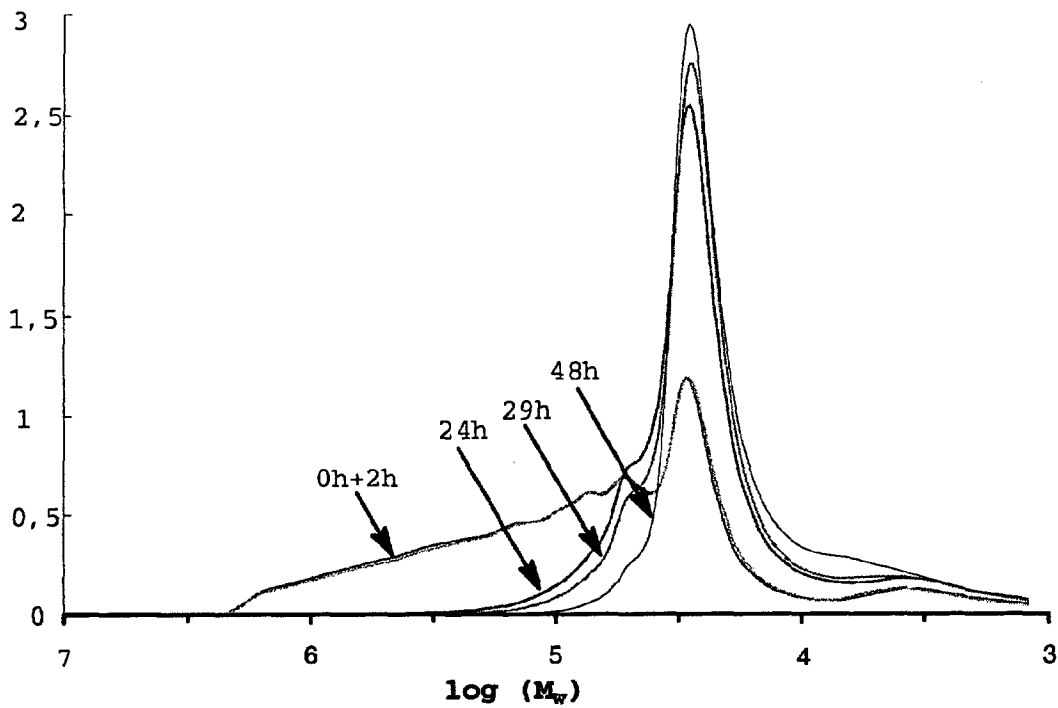


Figur 3

E98KF005.xxx

Figur 4

Fläche norm. [a.u.]





Europäisches
Patentamt
European Patent
Office
Office européen
des brevets

Description of DE19840489

Print

Copy

Contact Us

Close

Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

The instant invention concerns active substance preparing, are surrounded with which or several active ingredients of at least a layer or parts of a layer from a protein, with an enzyme the selected from the group of the lipooxygenases, Protein disulfid isomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Protein disulfid reduktasen, Tyrosinoxidasen or Sulfhydryloxidasen transversecrosslinked became.

In addition the invention concerns a method to the preparation of active substance preparing, are a surrounded in which or several active ingredients of at least a layer, as well as characterised in that at least one that that or the active ingredients surrounding layers or parts of these layers from a protein consists, with an enzyme the selected of the group of the lipooxygenases, Protein disulfid isomerasen, Phenoloxidasen, Lysyloxidasen, Protein disulfid reduktasen, Tyrosinoxidasen or Sulfhydryloxidasen transversecrosslinked became the use of the enzymes mentioned the formulation of active ingredients.

Further the invention food, feed or pharmaceutical preparing concerns the contained active substance preparation according to invention as well as the enzyme Lysyloxidase. In the special one the invention concerns dry powders, the vitamins, enzymes, food and feed additives, like z. B. Carotenoids contain. In addition various additives can be embedded if necessary.

Powdery active substance preparing such as vitamin and Carotinoid of preparations are well known and become in the pharmaceutical industry as well as in the food and feed industry in large scale used. In the literature many methods become the preparation of suitable preparations described.

To the preparation of powdery preparing, in which oxidation-sensitive cloths like oil-soluble vitamins or carotenoids against oxidative influences protected to become to be supposed, become various manufacturing methods, in particular spraying method described.

⚙ top In the German patent specification 10 35 319 described becomes, as a dispersion of an oily vitamin becomes sprayed into an high excess of powdery starch with a small moisture content (bottom 8%). Water is extracted by the dry strong powder from the sprayed particles. Thereby they solidify, whereby a large amount of the starch remains sticking to the surface of the particles. In addition the excess strong portion must become separated and subsequent again the process supplied.

In the Swiss patent specification 488,455 stated becomes that used as propellant means a mixture becomes from inorganic substances, which consists of hydrophobic and water-absorbent substances. Thereby the danger of explosion, which exists by the dry, finely divided starch, is to become avoided.

From the Swiss patent specification 389,505 is known that the dispersion of the active ingredient becomes a cooled in, gaseous medium sprayed, in which the sprayed particles by cooling solidify. For this process heads of up to 15 m become required, in addition the temperatures must become significant bottom room temperature maintained.

An other method to the solidification of the sprayed particles can take place also via collection in a powder, which consists of metal salts of higher fatty acids. This method becomes 431,252 described in the Swiss patent specification.

An alternative method to the preparation of wirkstoffhaltigen, stable preparing becomes 618,001 described in the European patent specification EP-A-0. The here made preparation of the spherical particles, which represent an imbedding of the active ingredient in a mixture from various carrier substances, by forming globules from a primary oil in water emulsion, which does not consist of the addition from active ingredients, ölförmigen cloths, proteins and waters to the one with water mixable solvents first by controlled division, and separates the subsequent obtained globules. For the preparation of the globules a particular mixing system is required. The here obtained particles are given subsequent with an aldehyde, for example acetaldehyde, glutaraldehyde or glyoxal subsequent treatment, whereby a chemical crosslinking, which are expressed also in the water insolubility of the obtained material, and thus an additional stabilization of the active ingredient achieved become.

In the American patent specification 4,670,247 an other method becomes the preparation of crosslinked particles described. For this first an emulsion, those essentially from a oil-soluble vitamin, becomes a protective colloid such as z. B. Gelatin and a reducing sugar exists, by a spraying and a drying process into powdery particles transferred. These particles become subsequent treated in a thermal process with temperatures between 105 and 180 DEG C. In a Maillard reaction between the amino group of the proteins and the Oxo groups of the reducing sugar thereby a water insolubility becomes the drying powder particle achieved, which becomes achieved by a crosslinking of the matrix components.

In EP 782883 edible microcapsules described, which contain a capsule wall, become, which become prepared by salting the protein out with an edible salt and crosslinking of the capsule wall with transglutaminase. Adverse one with this method is that it is not more applicable broad. So the transglutaminase is for example inappropriate for spraying formulations, since it does not know sprayed and dried Wirkstoffformulierungen any longer proper transversecrosslinked and so the active ingredients are already exposed during the storage an intensified degradation. If one waits to the crosslinking by the enzymatic activity completed is, then the formulations can be sprayed any longer.

If oxidation-sensitive compounds, into this cases in particular fat-soluble vitamins and carotenoids, come with air into contact, a made conversion with oxygen, which leads to an active substance loss by conversion to undesired compounds. In order to prevent this oxidation, one can add certain additions the preparing, which make these again fewer transmissive for oxygen by conversion with reactive groups of the proteins for the example and thus to the active ingredients a stabilizing protection lend. This can take place for example by means of the fact that becomes prevented by conversion of proteins with reducing sugars in the sense of a Maillard reaction the solubility of the proteins in waters. Further a crosslinking can become achieved by conversion of the proteins with aldehydes, which likewise lends support matrix an increased stability to that.

These methods show however certain disadvantages, which let it appear desirable to look for improved stabilization procedures. Thus the application of a Maillard reaction between a protein and reducing sugars means cases into each a thermal stress and thus at least into small amounts a degradation of the active ingredient. In addition the products are inclined to a brownish coloring. A method for the formulation of active ingredients over Maillard reaction is to be taken for example from the patent application EP-A-0 547,422.

From disadvantage with the use of chemical agents such as aldehydes or acidic ones like Tanninsäure as crosslinking agents it is that the crosslinking highly reactive and health not acceptable additives become used. The products, which become prepared after these methods, find only conditional absolute acceptability with the consumer.

It was therefore the object of the invention a light, inexpensive, to develop broad applicable method for the formulation from active ingredients to which does not exhibit the disadvantages specified above.

This object became by the invention process the preparation of active substance preparing, are a surrounded in which or several active ingredients of at least a layer, characterised in that at least one that that or the active ingredients surrounding layers or parts of these layers from a protein exists, which became selected with an enzyme from the group of the lipoxigenases, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen and peroxidases, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen or Sulfhydryloxidasen transversecrosslinked, dissolved.

The chemical function of these enzymes in the metabolism and/or. their chemical reaction is for example the writings of Green et al. (Biochem. J. 1983, 211, 481-493), Kagan et al. (To. J. Respir. Cell mol. Biol., 5, 1991, 206-210), Haywood et al. (Biochem. J., 1981, 199, 187-201) or Matheis et al. (J. Food Biochem. 11, 1987, to take 309-327).

By the favourable enzymatic crosslinking in the invention process both a thermal stress of the active ingredients becomes and with the thermal crosslinking that protein/sugar layer and a brown one of the formulations of active substance linked thereby over the Maillardreaktion as well as the use of reactive chemical substances such as aldehydes avoided. The Maillardreaktion with the thermal crosslinking leads to a linkage of reducing sugars with the free amino group of the proteins or other free amino group and thus to a stabilization of the Wirkstoffformulierungen. With the use from chemical compounds to the crosslinking of the proteins bridges between the aldehydes are usually formed the dialdehydes and the amino group of the proteins or other amino group. In the invention process the proteins become direct for example over in the proteins or lipoproteins present fatty acid residues, over Cytein Cysteinbrücken (= Cystinbrücken), over Michaeladditionsprodukte or over the formation of aldehydes from lysine with subsequent crosslinking over free amino group crosslinked.

This leads at least several active ingredients surrounding layer or parts of a layer from a protein, which became selected with an enzyme from the group of the lipoxigenases, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen and peroxidases, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen or Sulfhydryloxidasen transversecrosslinked to the new active substance preparing according to invention contained or. These active substance preparing according to invention exhibit no brownish coloring with a good stability and contain no chemical crosslinkers.

As active ingredients in the invention process or in the active substance preparing according to invention all active ingredients suitable used in the pharmacy, human or animal nutrition are in principle. Preferred active ingredients are vitamins, enzymes, food and feed additives.

Bottom enzymes in the invention process or in the active substance preparing enzymes are such as z as active ingredient. B. Hydrolases such as Amidasen, proteases, lipases, esterases, phospholipases, beta - glucosidasen, amylases, Nitrilasen, Mannanasen, phytases or xylanases, transferases such as Methyltransferasen or Aminotransferasen to understand oxidoreductases such as glucose oxidase or Isomerasen exemplarily.

In particular hydrophobic active ingredients are preferred, particularly preferred such, which are more oxidizable light. Such are the vitamins of the groups A, D, E and K as well as their mixtures the particular mixtures with carotenoids and/or Xanthophyllen. They can in the scope of the invention in the form of Vitaminlösungen in oils, when Provitamine become as well as pure vitamins natural or synthetic origin used. From particular interest preparations of vitamin are D3, vitamin c1, vitamin A and its derivatives, in particular from Vitamin A acetate, vitamin A-Palmitat and Vitamin A Propionat as well as their mixtures. Also the various vitamin of E-derivatives such as vitamin E-acetate, vitamin E-Palmitat are from interest. Preferred food and feed additives are carotenes, Xanthophylle and carotenoids such as beta - carotene and like z. B.: Astaxanthin, Astacin, Bixin, Norbixin, Capsorubin, Violaxanthin, Rubixanthin, Phodoxanthin, Apo-8' more carotinsäureethylester, Neurosporaxanthin, Citranaxanthin, Canthaxanthin, Zeaxanthin, beta - Apo-4' carotinal, beta - Apo-8' carotinal, beta - Apo-12' carotinal, beta - Apo-8' carotinsäure, Lutein, Capsanthin, Lycopin as well as ester of hydraulicXY and carboxyhaltigen members of this group, z. B. the low alkyl esters such as methyl or ethyl esters or

their mixtures.

The portions of the active ingredients amount to in the active substance preparing according to invention generally about 1 to 75 Gew. - %, preferably 5 to 50 Gew. - %, particularly preferred 10 to 35 Gew. - %, related to the dry matter of the powders.

The portions of vitamins or carotenoids amount to generally about 5 to 50 Gew. - %, preferably 10 to 35 Gew. - %, related to the dry matter of the powders.

Preferred ones are invention processes, with those a wirkstoffhaltige emulsion or dispersion into an atmosphere loaded with hydrophobierter silicic acid, which can be inertisiert if necessary, sprayed become. The atmosphere can being favourably also with another propellant means like an agent on basis of a carbohydrate such as starch or modified starch for example corn starch loaded.

In addition methods are preferred, with which after manufacturing the active substance preparation for example over spraying dried becomes. Preferred 10 Gew bottom up to a residual moisture become. - %, preferred bottom 6 Gew. - % dried. Also smaller remainder-moist can become adjusted.

The temperature of the invention process becomes essentially bottom 80 DEG C, preferred bottom 60 DEG C, maintained.

The invention relates to in addition active substance preparing available after an invention process, and such, which contain the 0,025-fachen to quadruple proportion by weight as additional feature concerning active ingredient at separating agents or parting agent mixtures, as well as foods or feed contained such a active substance preparation.

Preferred separating agents are hydrophobierte silicic acids, corn starch, by chemical treatment hydrophobierte corn starch, metal salts of higher fatty acids and other vegetable starch or mixtures of these separating agents. Particularly preferred is mixtures from at least one of these separating agents with other adjuvants such as inorganic compounds, which work as lubricants, as for the example Neusilin TM or Zeolex TM.

In the case of hydrophobic silicic acid the portion lies concerning active ingredient preferred in a range between 0,025 and 0,4, particularly preferred between 0,05 and 0,2. With corn starch the corresponding ratio preferred lies between 0,25 and 2, particularly preferred between 0,5 and 1,5.

The active substance preparing according to invention are essentially available these active ingredients contained by preparation of a dispersion, a protein and an other carrier and bulking agents z. B. from the group of the carbohydrates and/or natural or chemical modified starch. It can contain still other additives such as stabilisers or emulsifying aids. In addition it contains an enzyme, which is in the layer to link on many way protein molecules with one another. The thereby achieved crosslinking lends to the protein and concomitantly that matrix, are embedded in which the active ingredients, a reduced water solubility and thus an increased stability.

As protein in the invention process all proteins can become in principle used. Preferred crosslinkable proteins are from economic reasons gelatin, casein, Soja protein, wheat proteins, corn protein and collagen.

⚙ top

Preferred crosslinkable proteins are all forms of vegetable or animal proteins such as gelatin, z. B. Bone gel, cattle gel, fish gel, milk proteins, like z. B. Casein, soy proteins, wheat proteins such as glows, corn proteins and collagens, particularly preferred proteins are gelatin, milk proteins and soy proteins. Bottom gelatin in the invention process all forms are to be understood from gelatin to, no matter whether it concerns natural gelatins or around chemical modified derivatives.

For the preparation of the dispersion gelatin of the A and B-type in a far Bloombereich used becomes favourable with the invention process. With particular advantage one works with gelatin with a Bloomwert from approximately 50 to approximately 250.

The gelatin used one according to invention in amounts from 10 to 50 Gew. - %, preferably 15 to 40 Gew. - %, in particular 20 to 35 Gew. - %, related to the dry matter of the active substance preparation.

The proteins the mechanical stabilization plasticizing agents become favourable added such as sugar and/or sugar alcohols such as sucrose, glucose, sorbitol, sorbose, mannitol or polyols such as glycerol.

The crosslinking enzymes according to invention are selected from the group of the lipoxygenases, Proteindisulfidisomerasen (preferred E.C. - Class 5.3.4), Phenoloxidasen (preferred E.C. - Class 1,14.) and peroxidases (preferred E.C. - Class 1,11), Lysyloxidasen (preferred E.C. - Class 1.4.3), Proteindisulfidreduktasen (preferred E.C. - Class 1.6.4), Tyrosinoxidasen (preferred E.C. - Class 1,14) or Sulfhydryloxidasen (preferred E.C. - Class 1,8.). These can be animal, vegetable or microbial origin. Preferred ones are them microbial origin, i.e. from Eukaryonten such as funguses or yeast or prokaryotes as or gram negative bacteria or Archaeobakterien grampositiven. Preferred ones become as enzyme the Lysyloxidasen of various origin used. Particularly preferred becomes the Lysyloxidasen from yeast as from the genera Candida, Hansenula, Pichia, Sporobolomyces, Sporopachydermia, or Trigonopsis used. Whole particularly preferred is Lysyloxidasen from the genera and types Candida nagoyaensis, Candida nemodendra, Candida boidinii, Candida lipolytica, Candida steatolytica, Candida tropicalis, Candida utilis, Hansenula minuta, Hansenula polymorpha, Pichia pinus, Pichia pastoris, Sporobolomyces albo rubescens, Sporopachydermia cereana or Trigonopsis variabilis. Prominent suitable for the invention process is the Lysyloxidase from the genus and type Pichia pastoris.

The Lysyloxidase according to invention of Pichia patoris can be up-cleaned from the cell mass by Pichia pastoris to cells over a cell explanation, which became performed with conventional methods, an ion exchange chromatography with a subsequent Molekularsiebohromatographie and a final repeated ion exchange chromatography. With this cleaning pattern the Lysyloxidase with a purity of over 90%, preferred of over 95%, could become particularly preferred of over 99% shown.

The purified Lysyloxidase was submitted of a Proteinsequenzierung after Edman. That became N-terminal end as well as various peptides, which in one digest with trypsin obtained became, certain (see example 5).

The invention relates to thereby an isolated protein, which contains at least one of the subsequent sequences:

a aminoterminal sequence

G (S) (C) Q (C) KTNEKVNIAPKPNI (C) DT (L) (S)

or partial sequences, which correspond to peptides of the protein, which after one digest with trypsin obtained became:

EYP (C) APGVVYNTK

GGTYSTVTQNPTLNR

DYNIMPGGGXVHR

ATGGTYSTVXAQN

APETENNAR

GPL (P) VNE (E) TTIEPLSFYNT

IYELSLQELIAEYGSDDPNNQHTFYSDI

DNVDDLSCIIQR

VAPETENCAR

NVDVEYPCAPGVVYNTK

GYPNAEY (S) LDF/ER

and that epsilon - amino group of the lysine particular in a protein to aldehyde groups to oxidize knows. The letters and indicia in the sequences specified above have the subsequent importance: X is not an unknown amino acid, which could not become identified at this position, the parentheses means unique determinable amino acids, whereby the indicated amino acid, which is probable proper amino acid, means the diagonal stroke amino acid-alternative, whereby the amino acid before the diagonal stroke or after the diagonal stroke at the position the proper can be. By the oxidation epsilon - amino group finally comes it to the crosslinking of proteins, whereby ranges of the same protein crosslinked with one another to become to be able or various proteins.

The Lysyloxidase (= PROTEIN LYSINE 6-OXIDASE, EC 1.4.3.13 or LYSYL OXIDASE) the particular Lysyloxidase of Pichia pastoris the possible enzymatic crosslinking of proteins, whereby becomes favourable used as protein gelatin. Become epsilon -the amino group of the lysines aldehyde groups oxidized. These aldehydes can react then to bottom formation of Schiff' bases with the amino group of other lysines or other free amino group for example Aminozuckern. A special technical advantage for the user is the timed separation within the entire reaction sequence, i.e., the formation of the aldehydes from epsilon - amino group of the lysines and the reaction of the amino group with the formed aldehyde groups is timed separated. This offers opposite for example with the help of the transglutaminase a substantial advance to the enzymatic crosslinking, since with this reaction the crosslinking is always immediately made and thus no timed separation in the enzyme reaction and the crosslinking possible. This timed separation the possible favourable use of the enzymatic reaction for methods as for the example the preparation of active substance preparing over spray drying or over the so called Mikronisierungsverfahren (see EP-A-0 065193). An other advantage is the safety of the formed molecules, since they are a natural ingredient of the connective tissue (fig. 1 and 2). They become there generated of a fabric Lysinoxidase.

Fig. 1

Formation of an aldol transverse bridge from two Lysinseitenketten
EMI10.1

⌘ top

The enzymes mentioned can becoming in form of the cleaned enzymes or in the form of crude extracts from natural sources as from Eukaryonten such as funguses, yeast, animal or vegetable cells or prokaryotes like gram positive, gram negative bacteria or Archaeobakterien used. Also whole organisms or cells can become for the invention process used, as far as the enzymes become secreted in the extracellular environment or the cells were permeabilisiert. Preferred one becomes the invention process with cleaned enzymes or, as far as no undesirable Nebenaktivitäten is present, with crude extracts performed.

The enzyme quantities required for the crosslinking of the proteins and/or. - activities can be determined in conventional manner in the person skilled in the art known type by simple preliminary tests. Usually the enzymes in an amount become added that 20 to 100% of the transversecrosslinkable groups becomes for example the lysine residues in the protein crosslinked. Favourable way 0.001 becomes to 1000 of unit enzyme per gram protein, preferably 0.01 to 100 of unit enzyme per gram protein, particularly preferred 0.1 to 10 of unit per gram protein added.

The active substance preparing can contain or several active ingredients, whereby different Wirkstoffklassen can be contained such as vitamins or carotenoids or several active ingredients of a Wirkstoffklasse of for example several various carotenoids or vitamins or their mixtures in the preparing.

The active ingredients in the preparing can be by or several layers a surrounded. These layers can consist of or several transversecrosslinked according to invention protein layers or of or several transversecrosslinked according to invention protein layers and at least a chemical transversecrosslinked protein layer and/or other layers of natural or artificial polymers. The proteins transversecrosslinked after the invention process can be also parts at least one that or the active ingredients surrounding layer.

Bottom natural and/or artificial polymers are in principle all polymers more conceivable, which are suitable for the formulation of active ingredients. As natural proteins for example polymers seihen such as guar Gum, alginates, Carrageenan, pectins or polymers on basis of mannose and/or galactose mentioned. As artificial proteins its for example polymers on basis of acrylic acid, methacrylic acid, acrylates, Methacyliten or mixtures from these monomers as for example Eudragit L30D-55 (methacrylic acid: Ethyl acrylate, 1: 1) or Eudragit S (methacrylic acid: Methyl methacrylate, 1: 2). Also different monomers know beispielsweise monomers, which bring along a positive charge like Trimethylammonioethylmethacrylat, contained in the polymers its polylysine or Polyallylamin. Depending upon used polymer or polymer mixture the active ingredients can be manufactured to formulate in such a way with the help of the layers according to invention, it favourably make possible that or that them targeted at the effect place released to become to be able. Thus layers can the for example gastric juice-resistant be produced are, which dissolve in the intestine, which dissolve targeted in the stomach, which do not become dissolved by the Pansenmilieu or which with placing into the body the active ingredient after some time to only release. In fodder or foods the active ingredient can become so formulated that it becomes only

released after uptake of the active substance preparation into the body.

Becomes favourable the active ingredient or the active ingredients of or several protein layers surrounded transversecrosslinked over the invention process.

Those the active substance preparing contained emulsions become favourable using hydrophobic separating agents like hydrophobic silicic acid, natural starch, like z. B. Corn starch, hydrophobierte starch derivatives, like z. B. hydrophobierte corn starch, salts of langkettigen fatty acids or mixtures from these cloths sprayed. In addition, the separating agent can in the spray chamber z. B. as hydrophobic silicic acid particles in air or inert gas (z. B. Nitrogen) presented become. Subsequent one the made drying process of the sprayed particles if necessary after separation of the separating agents, if necessary bottom light heating to 80 DEG C, preferred to 60 DEG C, particularly preferred with room temperature, by treatment in an air or an inert gas current.

Additional ones to the mandatory ingredients become the dispersion with advantage still different compounds usual with the preparation of active substance drying powders, added.

Fig. 2

Reaction of the lysine residues with Allysin to the Schiff' base and other reaction to Lysinonorleucin, Desmosin and Isodesmosin EMI13.1

From particular importance for an use of the dry powders as feed additive an addition of Antioxidantien, like Ethoxyquin, is butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) or tocopherol, as well as stabilisers, like Ascorbylpalmitat, mono and Diglyceride, ester of monoglycerides with acetic acid, citric acid, lactic acid, Diacetylweinsäure, Polyglycerinfettsäureester, Sorbitanfettsäureester, propylene glycol fatty acid ester, Stearoyl-2-Lactylat, phosphoric acid or phytic acid and their alkali or alkaline-earth salts, or however complexing agents, like ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or nitrilotriacetic acid with oxidation-sensitive active ingredients (NTA).

Frequent ones become the emulsion in addition, moist retaining means, like glycerol, Sorbitol, polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycols or also additional emulsifiers, like lecithin, added.

In addition additions proved such as carbohydrates such as sugar, starch or starch derivatives in particular corn starch or maltodextrin or thickening means, like Gummiarabicum, guar gum, Traganth, agar agar, Carrageenan, Locust Bean Gum, alginates, pectins, xanthan, Curdlan and certain diminished starch for adjustment the viscosity of the emulsion as useful.

Concerning closer details over importance, type and amount of such additions we refer Fat soluble of vitamin" to corresponding technical literature, for example to the above Monographie ", volume. 9, in particular pages 128 to 133.

By these additions the active substance preparing become favourably stabilized and adapted to the special Darreichungsbedingungen.

⚙ top

For the execution of the invention process one proceeds for example in such a way that one brings the active ingredients contained dispersion gelatin to that to the preparation in hot water (from 50 to 70 DEG C) to the solution, to this solution the sugar, the revision modification November heirsch fertilizing, the vitamins and/or carotenoids, stabilisers and the other usual additives as well as if necessary. still additional waters added and the whole by vigorous agitation with elevated temperature dispersed. For the enzymatic crosslinking of the powder taking place in the last processing step the finished dispersion in a pH range from 4 to 10 should be present, which can become by addition of bases, like NaOH, KOH, approx. (OH) 2, MgO, soda or NH4OH or by addition of basic responsive salts such as sodium acetates or Na2HPO4 adjusted. The so prepared dispersion can become after conventional methods into a dry powder transferred for example by spray drying, Sprühgranulation or other usual drying methods.

Other embodiments of the invention process are for example the use of the enzymatic crosslinking with the different Mikronisierungsverfahren.

In EP-B-0 065,193 for example a method becomes the preparation of very finely divided free-flowing powders of the carotenoids described, whereby the carotenoid in a volatile with water mixable organic solvents with temperatures between 50 DEG C and 200 DEG C, becomes if necessary bottom increased pressure, within a time of less than 10 seconds dissolved and the subsequent so obtained molecular-disperse solution precipitates immediately by rapid mixing with an aqueous solution of a swellable colloid with temperatures between 0 DEG C and 50 DEG C the active ingredient in colloid-disperse form. The dispersion becomes subsequent of the solvent and the dispersing medium in conventional manner freed. As swellable colloids proteins become used. These can become by addition of the enzymes in the invention process, specified above, transversecrosslinked. Favourable way the enzymes of the aqueous Mikronisatlösung before the drying step added become, so that sufficient reactive groups for the crosslinking become prepared, before the drying process made. Other indications to the method are to be taken from EP-B-0 065,193.

EP-B-0 410,236 describes an other method to the preparation of a colloid-disperse Carotinoidpräparation, whereby a suspension of a Carotinoides in a high-boiling oil becomes brought during a period of at the most 30 seconds with superheated water vapor in contact. In place of the oil for the loosening of the carotenoids also organic solvents can become such as chloroform, methylene chloride, carbon tetrachloride or trichloroethylene used (see to DE/OS 12 11 911). Subsequent one is emulsified the obtained mixture with an aqueous solution of a protective colloid and the emulsion thereafter sprayed and dried. Proteins become also here used as protective colloids, which in the invention process over the addition of the enzymes mentioned before mixing and spraying transversecrosslinked to become to be able. Other indications to the method are to be taken from EP-B-0 410,236.

EP-B-0 498,824 describes an additional advantageous process to the preparation of microdisperse active substance preparing. A

carotenoid in presence of a Schutzkolloides becomes for example a protein such as gelatin milled and the formed suspension subsequent dried as active ingredient.

By addition that in the invention process of used enzymes the proteins can be favourably interlaced and stabilized the active substance preparation. Feed indications to the manufacturing method are the patent specification mentioned to infer and WHERE 94/19411.

The subsequent subsequent treatment of the dispersion to the powders according to invention can take place after all literature-known methods.

Pathways of the desired particle size distribution of the powders (0.1 to 0.6 mm diameters) such methods become preferred, with which provisions are met that the gelled droplets of the dispersion from each other separated remain, until itself its form has stabilized.

Mentioned ones are for example the method in accordance with EP-B1-74050, sprayed with which the dispersion becomes in hydrophobic silicic acid or a metal salt of a higher fatty acid or however the method in accordance with EP-B1 285,682, becomes sprayed with which the dispersion in strong powders. It proved that in particular with method, those for preparing with gel-maintained of bottom 35 Gew. - become % used, the spraying with hydrophobierten silicic acids as propellant means is particularly favourably feasible.

After the described methods generated powders normally less than 6% possess after drying a water content of less as 10%. The so obtained powdery preparations consist of particles with good formed surface. They separate in warm water from approx. 40 DEG C rapid to a milky dispersion.

The active substance preparing according to invention are suitable favourably for the preparation pharmaceutical preparing, as well as for the preparation of food and feed.

Examples

Example 1

Preparation of the Lysyloxidase with Pichia pastoris - Lu 583 -

The strain became cultivated on YM-agars:

<tb>< TABLE> Columns=2>

<tb><TSB Difco

& top <tb> 20 g/l< September> agar Difco

<tb>< /TABLE>

The plates were bebrütet with 28 DEG C for 48 h and are more durable thereafter with 45 DEG C for at least 4 weeks.

Vorkultur and fermentation medium

10 g/l glucose (30 min. with 121 DEG C autopianos)
separate set and 30 min with 121 DEG C autopianos:

0.2 g/l magnesium sulfate x 7 H₂O

3.0 g/l Kaliumdihydrogenphosphat

0.2 ml/l salt solution after Vishniac & Santer*

separate set and sterile-filter:

10 ml/l Vitaminlösung after Lodder **

The medium components become combined after the sterilization.

* Prescription of the salt solution. After Vishniac & Santer

50 g/l Titriplex III

22 g/l zinc sulfate x 7 H₂O

5.54 g/l calcium chloride

5.06 g/l manganese chloride x 4 H₂O

4.99 g/l Eisensulfat x 7 H₂O

1.1 g/l Ammoniumheptamolybdat x 4 H₂O

1.57 g/l copper sulfate x 5 H₂O

1.61 g/l cobalt chloride x 6 H₂O

adjust 6,0 with KOH to pH

** Prescription of the Vitaminlösung after Lodder

20 mu g/l biotin

20,000 mu g/l approx.-pantothenat

2 mu g/l folic acid

10,000 mu g/l inositol

200 mu g/l p-Aminobezoesäure

400 mu g/l Niacin (nicotinic acid)

400 µg/l Pyridoxinhydrochlorid
200 µg/l riboflavin
400 µg/l Thiaminhydrochlorid

Vorkultur

For 10 l-fermenters 2 x 250 ml Vorkultur (= VK) in the 1 l-Erlenmeyer flask (= EMK) with in each case 3-4 Platinösen Lu 583 were inoculated and 24 h with 28 DEG C and 200 Upm were inkubiert.

Main culture

Approach in 10 l-Infors-fermenters with the subsequent conditions:

Temperature: 28 DEG C

Ventilation: 5 l/min. over ring aeration

Speed: 400 Upm.

Fermenter assembly: 3 x of standard agitating sheets as well as incorporated breakwaters

Before the start of the fermentation n-butyl amine solution in waters became the pH on approx. by the addition of 50%iger (V/V). 7.0 adjusted. Subsequent one was inoculated the fermenter with 2 x 250 ml Vorkultur. The fermentation duration amounted to about 28-30 h. The time of the fermentation end became fixed over the determination of the OD with 600 Nm. The OD 600 of the fermenter samples became measured thereby against air and should be about 0.9-1.0. With higher OD decreases the activity of the enzyme rapid.

Workup

Fermenter contents became in a Hereaus Cryofuge 8000 with 45 DEG C and 5000 Upm (corresponds approx. 9500 x g) 20 min. centrifuged. The entire bio moist mass was again centrifuged in 250 ml 50 mm of potassium phosphate buffers washed and. The cell mass can become with -15 DEG C in the Tiefkühlschrank stored.

Cell explanation and measurement of the Lysyloxidase

The bio moist mass (100 ml) became with 100 ml glass beads (diameter 0.5 mm) in the ball mill bottom ice cooling 30 minutes with 5000 revolutions per minute comminuted. The homogenate was centrifuged over gauze of filtered and then for 10 minutes with 10,000 RPM and 4 DEG C. The activity of the projection became determined by a HPLC test. The Lysyloxidase changes benzylamine in benzaldehyde over (detection with 250 Nm). The amount at developed benzaldehyde became determined over a calibration curve.

⚙ top

Run conditions

Buffer A: Water, 0.1% TFA

Buffer B: Acetonitrile, 0.1% TFA

0 minutes 40% B

6 minutes 70% B

6.1 minutes 100% B

6.5 minutes 100% B

Flow 1 ml/min

6.5-9 min back on 40% B, flow 1.5 ml/min

The Lysyloxidase of contained projections of 7 x 10 l fermenters became collected and combined. An activity of 125,5 U/l in 1, 8 l resulted.

Example 2

Mark of the gelatin with fluorescent dyes and crosslinking of the gelatin by the Lysyloxidase

Gelatin (10 g) became 9.0 dissolved in 50 mm of sodium borate buffers pH. The pH was placed behind controlled and with 0,5 M NaHCO₃. The fluorescent dyes Cy-5 or Bodipy 630/650-X, SE became in 5 ml DMSO (= dimethylsulfoxide) dissolved and in a weight ratio of 1: 100 the proteins added. During 16 hours with room temperature the responsive Succinimidylester of the dyes with the free amino group of the proteins. The reactions became then 5 times against large volumes 20 mm of sodium phosphate buffers with 0,01% azide dialyzed and with -20 degree Celsius as one percent protein solution stored.

In 4 l-Rührkolben existing became from combined projections of Lysyloxidase Fermentationslösungen in 1800 ml a solution, (ZH 29303/5; 125.5 U/l) with 40 DEG C 454 g gelatin A 100 Bloom by agitation in solution brought. In addition doped gelatin (see above) became given with Bodipy. The entire approach became 48 h with 40 DEG C agitated, whereby the flask did not become closed, in order to make possible a permanent Luftzutritt and thus the access from oxygen to.

Samples became à 300 g removed from the solution in the indicated timed distances:

Sample 1: immediately after starts of the trial
 Sample 2: after 2 hr.
 Sample 3: after 5 hr.
 Sample 4: after 24 hr.
 Sample 5: after 29 hr.
 Sample 6: after 48 hr.

The samples were regenerated as follows:

a) 200 g became direct with an a material nozzle into a cloud from hydrophobierter silicic acid (Sipernat D 17) particles of approx. 200 μm diameter sprayed. The obtained moist product became divided; an half became dried with room temperature and the other with 80 DEG C in each case on a Nutsche in the air flow.
 b) The residual 100 g became after addition of vitamin A, Isosweet and corn starch after a emulsifying of the oil phase with an Ultraturrax apparatus in same way sprayed and by drying process of the spraying product with room temperature into a dry powder converted. These products had the subsequent composition:
 25% vitamin A-acetate staff. with Ethoxyquin and BHT
 30% gelatin A 100 Bloom
 25% corn starch
 15% Isosweet
 Remainder: Water + Sipernat D of 17 + remainders from fermentation arrears

Example 3

Measurement of the crosslinking by fluorescence correlation spectroscopy (= FK)

The FK is a method, which is based on the number fluctuation of spectroscopy. With the FK can diffusion coefficients and number concentrations of fluorescent molecules in high-diluted solution measured become. The Fig. 1 and 2 shows the structure of an FCS apparatus and its operating principle. A laser beam becomes over a microscope objective into much a small volume of a liquid sample focussed and the fluorescence measured lively therein.

Fig. 1 shows an FCS apparatus. The focussed laser beam and the confocal diaphragms define a very small observation volume (the confocal volume) in the sample. The timed fluctuations of the fluorescence from this volume become analyzed with a correlator.

Fig. 2: (= number fluctuations in the observation volume t lead) to fluctuations of the FCS signal $I(t)$. From the autocorrelation function $G(t)$ of the FCS signal know the average residence time τ (= middle time for the diffusion of a particle by the observation volume) and the number of the molecules N in the measuring volume to be read off. τ is direct proportional to the size of the fluorescent molecules.

⌘ top

The volume is so small with the fact that in it on the average only few particles are. The particle number in the volume varies by diffusion continuous around an average value N . Thus also the fluorescence intensity $I(t)$ varies around an average value \bar{I} . From the fluctuations of the fluorescence τ (proportional to the molecular size) and the number concentration of fluorescent molecules calculated leave themselves the diffusion time (see Fig. 1).

Determination of the molecular weights by gel permeation chromatography (GPC)

The determination of the molecular weight distribution (MGV) made by means of GPC. The most important attempt parameters:

Column: TSK gel, 4000 SWXL, 250,4 mm
 Eluent: 0.01 M NaH_2PO_4 , 0.1 M Na_2SO_4 , 1% SDS
 pH: 5,3
 Temperature: 30 DEG C
 Flow: 0,5 ml/min
 Detection: UV spectrometer, 220 Nm

The sample preparation became approx. in each case. 0.5 g substance into 100 ml eluents for 15 min with $T = 60$ DEG C agitated. The so obtained cloudy solution became by 0.2 μm -filters a filtered and a subsequent into the sample loop of the GPC apparatus injected (approx. 20 μl). Water-soluble gel ingredients could not not be detected.

As direct measured variable one received the intensity signal of the detector (measure for the concentration) with this method as function of the Elutionszeit. With the GPC the molecules became RH separated after their hydrodynamic radius. Molecules with large RH thereby more rapid eluiert as molecules with small RH.

Over a calibration with standard polymers (here: Pullulstandards) could become from the Elutionsdiagrammen MGV calculated [see M. D. Lechner, K. Gehrke and E. H. North Meier, in: "Macromolecular chemistry", Chapter 4.3.6.1. , Birkhäuser publishing house (1996)]. Between the Elutionszeit width unit and the molar mass M of the Pullulstandards the subsequent proportionality applies in first approximation:
 width unit INFINITY $\log(M)$ (1)

Leave themselves more exact with an application of width unit vs. $\log(M)$ the data however with a polynomial of third degree describe. From the inverse one of this polynomial gel molecular weights can become calculated from the gel elution times. The so obtained molecular weights are thus no absolute gel of molecular weights (like it z. B. from the LS obtained to become to be able), but only relative molecular weights (related to the here used standards). Further it is to be noted that due to the Pullulstandards the Elugramme only within the range of 12 min, standing for the order $< t < 25 \text{ min}$ (SIMILAR $10 < 3 > \text{ g/mol} < \text{Mg} < 10 < 7 > \text{ g/mol}$) meaningful into the corresponding molecular weights converted to become to be able. Approximate one [see equation (1)] is with a semilogarithmic application (width unit vs. $\log(M)$) the surface the bottom curve of the examined substance quantity of proportional. The Elutionsdiagramme became normalized on same total areas, so that the surfaces the bottom curves - and thus the respective substance quantities - could become direct compared with one another.

The subsequent observations became made: With increasing durations of the incubation of the labeled gelatin with the unlabeled gelatin and the Lysyloxidase the value rope (proportional the molecular size) became simultaneous with measurements by the FK always small and took off the intensity (I, kcps) to the fluorescence (table 1, Fig. 3).

Further a decrease of the hochmolekuaren gel portions became observed in the GPC with increasing incubation period (table 2, Fig. 4).

By the incubation of the gelatin with Lysyloxidase the gelatin became crosslinked. These crosslinked portions could become in waters completely dissolved no longer, but were present than poured gel particles. With the FK and GPC sample preparation these particles by centrifugation or filtration separated and could no more not be detected.

With increasing incubation period the preferred high molecular gel portions from the Elugramm disappeared to the gelatin. This means that the straight high molecular gelatin portions are superproportional from the crosslinking affected. From random reasons this behavior is quite meaningful. In addition, in addition a molecular weight-dependent distribution of the Lysingruppen for this finding with responsible could be.

The decrease of rope by FCS measurements is to be interpreted as decrease of the molecular weight and could by gel permeation chromatography direct shown become. The decrease of the intensity is to be due to the decrease of the number of fluorescent particles in the projection of the backsolved preparations. By crosslinking large gel molecules with higher probability became affected than small molecules. In addition small molecules can leave the network resulted from the effect of the Lysyloxidase better than uncrosslinked, large gel molecules, which stay in the insoluble part.

With the fact shown could become that by the Lysyloxidase for a crosslinking a sufficient number of Allysinen and late Schiff' bases formed become.

Example 4

Proof of the crosslinking by a rapid, parallelisierbaren test in microtitre plates



top

Gelatin became with 1 mM/l N-hydroxysuccinimide activated biotin with pH of 8.4 against a 20 mM phosphate buffers pH 7.4 multiple dialyzed subsequent labeled in a borate buffer and. The ability of the so modified gelatin to bind avidin or streptavidin could become in preliminary tests shown. 10 and 100 mg/ml gelatin binds after Biotin modification to the surface of a Biacore sensor chip modified with avidin. Not modified gelatin did not become bound to this surface.

Test principle and execution

Gelatin was adsorbed to the surface by microtitre plates. Afterwards became Biotin labeled gelatin and the transversecrosslinking substance/enzyme added. Adsorbed gelatin became crosslinked with biotinylated gelatin. After an intensive washing step the Biotinylierung became by a Streptavidin peroxidase complex detected.

0,4 ml a one percent gelatin solution in 0,1 M NaHCO_3 , pH 9.2 one adsorbed for 3 hours with room temperature at NUNC MaxiSorp Elisaplaten. Afterwards three times 0.05% Tween became 20 solution washed with PBS.

Afterwards biotinylated gelatin became and in various concentrations Quervernetzer added. This became 20 performed in a PBS buffer with 5 mM DTT and 0.1% Tween. The microtitre plates were inkubiert subsequent for various times with various temperatures. Afterwards the plate became 6 times washed, in order to remove non-reacted material.

The proof Streptavidin peroxidase of the company became Boehringer 1: 10,000 in PBS, 0.1% Tween 20 diluted and 1 ml per wave added. It became again 30 minute at room temperatures (approx. 23 DEG C) inkubiert. After an other washing step 0.015 became ml reaction mixture (0.1 ml 42 mM tetramethylbenzidine in DMSO, 10 ml 0.1 M sodium acetate, pH 4.9) added adjusted with citric acid. A blue color solution formed in courses of the reaction. The reaction became after 5 minutes with 0,1 ml 2 M sulfuric acid stopped. The blue color became yellow thereby. Subsequent one the made measurement of the absorption with 450 Nm.

Example 5

Purification of the Lysyloxidase

Homogenisation

The cells of *Pichia pastoris* (approx. 18 ml) became after storage with -20 degrees C thawed and with buffer A (20 mm sodium phosphate, 1 mm ethanolamine, pH 7.0 to 50 ml diluted. 50 ml glass beads, diameter 0.5 mm, added and 30 minutes became with 5000 rpm bottom cooling through egg homogenized. The homogenate became filtered over gauze. The filtrate was centrifuged 10 minutes with 8000 RPM and 4 degrees C.

Ion exchange chromatography

The projection became applied with NaOH on pH 7.0 again adjusted and on a Q-Sepharose (Q-Sepharose nearly flow, Pharmacia, diameter 5 cms, height of 13 cms, volume 250 ml). After the job (conductivity 0.7 mS/cm, 540 ml) buffers became A washed with 600 ml. The column was eluierd with linear gradient by 1 l a buffer A and 1 l buffer B (like buffer A with 1 M NaCl). The active fractions became collected.

Molecular sieve chromatography

The value parliamentary group became after concentration over 10 kDa omega filters on a preparative Superdex column (Pharmacia, diameter 2.6 cms, length 60 cms volume 320 ml) in 20 mm a sodium phosphate buffer, 150 mm of NaCl, 1 mm ethanolamine, pH 7.5 separated. Flow 3 ml/Minute. The active fractions became collected.

Ion exchange chromatography

The value parliamentary group of the Molekularsiebohromatographie became again purified by chromatography at a mono Q column (Pharmacia, HR5/5). The gradient became from buffer A and buffer B generated. Flow rate 1 ml/Minute, 100 fractions to ever 1 ml. The Lysyloxidase eluierte as active main protein. The protein had bottom reducing conditions a molecular weight of approx. in the SDS gel. 121,000 there.

The subsequent sequences became obtained:

Aminoterminal sequence

G (S) (C) Q (C) KTNEKVNIEAPKPNI (C) DT (L) (s) of sequences, which correspond to peptides of the protein, which after one digest with trypsin obtained became:

EYP (C) APGVVYNTK

GGTYSTVTQNPTLNR

DYNIMPGGGXVHR

ATGGTYSTVXAQN

APETENNAR

GPL (P) VNE (E) TTIEPLSFYNT

⚙ top IYELSLQELIAEYGSDDPNNQHTFYSDI

DNVDDLSTIIQR

VAPETENCAR

NVDVEYPCAPGVVYNTK

GYPNAEY (S) LDF/ER

Table 1
EMI26.1

Table 2
EMI26.2



Europäisches
Patentamt
European Patent
Office
Office européen
des brevets

[Claims of DE19840489](#)
[Print](#)
[Copy](#)
[Contact Us](#)
[Close](#)

Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

1. Methods to the preparation of active substance preparing, are a surrounded in which or several active ingredients of at least a layer, characterised in that at least one that that or the active ingredients surrounding layers or parts of these layers from a protein exist, which became selected with an enzyme from the group of the lipoxigenases, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen and peroxidases, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen or Sulfhydryloxidasen transversecrosslinked.

2. Method to the preparation of active substance preparing according to claim 1, characterised in that that or the active ingredients or or several active ingredients in solution with crosslinkable protein and enzyme for coating, surrounding with at least a layer, a mixed becomes, whereby the weight ratio lies between active ingredient and protein between 1 to 100 and 5 to 1.

3. Process according to claim 1 or 2, characterised in that as active ingredient of vitamins, enzymes, food additives or feed additives used becomes.

4. Method after the claims 1 to 3, characterised in that the active ingredient hydrophobic is.

5. Method after the claims 1 to 4, characterised in that a crosslinkable protein selected from the group gelatin, casein, soy protein, wheat protein, corn protein or collagen used becomes.

6. Method after the claims 1 to 5, characterised in that an enzyme used recovered from microorganisms becomes.

7. Method after the claims 1 to 6, characterised in that the crosslinking with the enzyme Lysyloxidase performed becomes.

8. Method after the claims 1 to 7, characterised in that one at least an active ingredient with an aqueous solution from crosslinkable protein and enzyme mixed and sprayed.

9. Process according to claim 8, characterised in that in an atmosphere sprayed loaded with hydrophobic silicic acid, corn starch or hydrophobierte corn starch becomes.

10. Method after the claims 1 to 9, characterised in that the active substance preparation up to a residual moisture of bottom 10 Gew. - becomes % dried.

11. Method after the claims 1 to 10, characterised in that the temperature with the preparation of the active substance preparation of essentially bottom 80 DEG C maintained becomes.

12. Active substance preparation available after a method in accordance with the claims 1 to 11.

13. Active substance preparation contained at least or several active ingredients surrounding layer or parts of a layer from a protein, which became selected with an enzyme from the group of the lipoxigenases, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen and peroxidases, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen or Sulfhydryloxidasen transversecrosslinked.

14. Active substance preparation according to claim 13, whereby the active ingredients are selected from the group:
Carotenoids
Xanthophylle
Vitamin A
Vitamin E
Vitamin D3
Vitamin c1

15. Active substance preparation according to claim 13 or 14, which contains the 0,025-fachen to quadruple proportion by weight concerning active ingredient at separating agents or parting agent mixtures.

16. Active substance preparation after the claims 13 to 15, whereby the active substance content in the active substance preparation between 1 to 75 Gew. - is appropriate for %.

17. An isolated protein, which contains at least one of the subsequent amino acid sequences
G (S) (C) Q (C) KTNEKVNIEAPKPNI (C) DT (L) (S)
EYP (C) APGVVYNTK
GGTYSTVTQNPTLNR
DYNIMPGGGXVHR
ATGGTYSTVXAQN
APETENNAR
GPL (P) VNE (E) TTIEPLSFYNT
IYELSLQELIAEYGSDDPNNQHTFYSDI
DNVDDLSCITIIQR
VAPETENCAR
NVDVEYPCAPGVVYNTK
GYPNAEY (S) LDF/ER
and that epsilon - amino group of the lysine to aldehyde groups to oxidize knows.

18. Use of an enzyme selected from the group of the lipxygenases, Proteindisulfidisomerasen, Phenoloxidasen and peroxidasen, Lysyloxidasen, Proteindisulfidreduktasen, Tyrosinoxidasen or Sulfhydryloxidasen for the formulation of active substance preparing.

19. Food or feed, a contained active substance preparation after the claims 13 to 16.

20. Pharmaceutical preparation, a contained active substance preparation after the claims 13 to 16.

 top